



(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局

(43) 国際公開日  
2001年1月18日 (18.01.2001)

(10) 国際公開番号  
WO 01/04298 A1

PCT

(51) 国際特許分類:  
C12N 15/12, 1/15, 1/19, 1/21,  
5/10, C07K 1447, 1618, 708, C12P 21/02, A61K 38/10,  
38/17, 48/00, A61P 25/28, 13/02, 13/12, 9/02, 9/12, 9/10,  
27/00, G01N 33/53, 33/56

(21) 国際出願番号: PCT/JP0004484  
(74) 代理人: 井理士 高橋秀一, 外(TAKAHASHI, Shuichi et al.); 〒532-0024 大阪府大阪市淀川区十三本町7丁目17番85号 武田薬品工業株式会社 大阪工場内 Osaka (JP).

(22) 国際公開日: 2000年7月6日 (06.07.2000)  
(25) 国際出願の言語: 日本語  
(26) 国際公開の言語: 日本語  
(30) 優先権データ: 1999年7月8日 (08.07.1999) JP 特願平11/194091

(71) 出願人(米国の除外を除く全ての指定国について): 武田薬品工業株式会社 (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.) (JP/JP); 〒541-0045 大阪府大阪市中央区通修町四丁目1番1号 Osaka (JP).  
(84) 指定国(広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーロパ特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TR, TM), ユーロパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(72) 発明者: および  
(73) 発明者/出願人(米国の除外を除く全ての指定国について): 田嶋 司 (SUGO, Tokuaki) (JP/JP); 〒300-3261 茨城県つくば市花畑2丁目7番地26 ナクノタウン第301号 Ibaraki (JP). 栗原 典喜 (KURIHARA, Mikio) (JP/JP); 〒300-2436 茨城県筑波郡吾和原村緑の台3丁目19番2号 Ibaraki (JP). 北田 千恵子 (KITADA, Chieko) (JP/JP); 〒590-0073 大阪府

(54) Title: NOVEL PHYSIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCE, PROCESS FOR PRODUCING THE SAME AND USE THEREOF  
(54) 発明の名称: 新規生理活性物質、その製造法および用途

(57) Abstract: A uroterisin II-like peptide originating in rat or mouse which is an SENR ligand or its salt; a nucleic acid encoding this SENR ligand; a method/kit for screening a compound capable of altering the binding properties of the SENR ligand to SENR, etc. DNA encoding the above-described polypeptide or the polypeptide is usable in: (1) searching the physiological effects of the above polypeptide; (2) constructing synthetic oligonucleotide probes or PCR primers; (3) acquiring DNA encoding an SENR ligand or a precursor protein; (4) developing a receptor-binding assay system and screening candidate compounds for drugs by using a recombinant receptor protein expression system; (5) acquiring an antibody and an antiserum; (6) developing diagnostics with the use of the DNA, RNA, antibody or antiserum; (7) developing drugs such as central nervous function controlling agents, circulatory function controlling agents and heart function controlling agents; (8) gene therapy; and the like.

(続要あり)

## (57) 要約:

本発明は、SENRリガンドであるラット及びマウス由来のウロテリンシンII様ペプチドまたはその塩、該SENRリガンドをコードする核酸、SENRリガンドとSENRとの結合性を変化させる化合物のスクリーニング方法/スクリーニング用キット等を提供する。

本発明のポリペプチドをコードするDNAまたは本発明のペプチドは、①本発明のポリペプチドの有する生理作用の探索、②合成ペプチドのスクリーニング方法/スクリーニング用キット等を提供する。③リゴヌクレオチドプローブあるいはPCRのプライマーの作成、④SENRのリガンドや前駆体タンパク質をコードするDNAの入手、⑤組織型レセプター-蛋白質の発現系を用いたレセプター結合アッセイ系の開発と医薬品候補化合物のスクリーニング、⑥抗体及び抗血清の入手、⑦DNA、RNA、抗体または抗血清を用いた診断薬の開発、⑧中枢神経機能調節剤、循環機能調節剤、心臓機能調節剤等の医薬の開発、⑨遺伝子治療等に用いることができる。

## 明 細 書

## 新規生理活性物質、その製造法および用途

## 5 技術分野

本発明は、G蛋白質共役型レセプター蛋白質であるSENRR (sensory epithelium neuropeptide-like receptor) に対する新規ポリペプチド、及びこれをコードするDNAに関する。

## 10 背景技術

多くのホルモンや神経伝達物質は細胞膜に存在する特異的なレセプターを通じて生体の機能を調節している。これらのレセプターの多くは共役しているguanine nucleotide-binding protein (以下、G蛋白質と略称する場合がある)の活性化を通じて細胞内のシグナル伝達を行い、また7個の膜貫通領域を有する共通した構造をもっていることから、G蛋白質共役型レセプターあるいは7回膜貫通型レセプターと総称される。

このようなホルモンや神経伝達物質とG蛋白質共役型レセプターとの相互作用を通じて生体のホメオスタシスの維持、生殖、個体の発達、代謝、成長、神経系、循環器系、免疫系、消化器系、代謝系、神経系の調節、感覚受容などの生体にとって重要な機能調節が行われている。このように生体機能の調節には様々なホルモンや神経伝達物質に対するレセプター蛋白質が存在し、その機能調節に重要な役割を果たしていることがわかっているが、未知の作用物質(ホルモンや神経伝達物質など)およびそれに対するレセプターが存在するかどうかについては未だ不明なことが多い。

近年、G蛋白質共役型レセプター蛋白質がその構造の一部にアミノ酸配列の類似性を示すことを利用して、ポリメラゼ・チェーン・リアクション(Polymerase Chain Reaction: 以下、PCRと略称する)法によって新規レセプター蛋白質をコードするDNAを探索する方法が行われるようになり、数多くの、リガンドが不明ないわゆるオーファンG蛋白質共役型レセプター蛋白質

がクローニングされている(Liberl, F., et al. Science, 244, 569-572, 1989, Welch, S. K., et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 209, 606-613, 1995, Marchese, A., et al., Genomics, 23, 609-618, 1994, Marchese, A., Genomics, 29, 335-344, 1995)。また、ゲノムDNAあるいはcDNAのランダムな配列決定によっても、新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質が次々と見出される(Nomura, N., et al., DNA Research 1巻, 27-35頁, 1994年)。これらのオーファンG蛋白質共役型レセプター蛋白質のリガンドを決定する一般的な手段としては、G蛋白質共役型レセプター蛋白質の一次構造上の類似性から推定するしかなかった。しかし、多くのオーファンG蛋白質共役型レセプター蛋白質は既知のレセプターとのホモロジーが低いものも多く、実際は既知リガンドのレセプターサブタイプである場合を除いては一次構造上の類似性だけでそのリガンドを推定することは困難であった。一方、遺伝子解析から多くのオーファンG蛋白質共役型レセプターがみつかったことから対応する未知のリガンドがまだ数多く存在していることが推定されているが、これまで実際にオーファンG蛋白質共役型レセプターのリガンドを同定した例は数少ない。

最近、動物細胞にオーファンG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするcDNAを導入し、新規オリゴペプチドを探索した例が報告されている(Reinscheid, R. K. et al., Science, 270巻, 792-794頁, 1995年, Menular, J., et al., Nature 377巻, 532-535頁, 1995年)。しかしこの場合は既知G蛋白質共役型レセプター蛋白質との類似性や組織分布から、容易にリガンドはオリゴペプチドファミリーに属することが予想されていた。オリゴペプチドレセプターを介して生体に作用する物質の研究・開発の歴史は長く、種々のアゴニスト・アゴニストが開発されていた。そこで人為的に合成した化合物群の中からこの受容体に対するアゴニストを見出し、それをプローブとして受容体cDNA導入細胞における受容体の発現を検証した後に、アゴニストと同じ様な細胞内情報伝達系の活性化物質を探索し、これを精製し、リガンドの構造を決定している。

またカタツムリのオーファンG蛋白質共役型レセプター (GRL104) をコードするcDNAをCHO細胞に導入してレセプター発現細胞での特異的な

細胞内遊離カルシウム濃度の上昇を指標として新規生理活性ペプチドを同定した例が報告されているが (Cox, K. J. A., et al., J. Neurosci., 17(4), 1197-1205, 1997)、この新規生理活性ペプチドは既知のleucokininと高い相同性を有し、GR L104は既知のleucokininとの反応性もあった。このようにオーファンG蛋白質共役型レセプター蛋白質の中でリガンドがおおよそ推定されうるものはほとんどなく、特に、既知のG蛋白質共役型レセプター蛋白質ファミリーと類似性が低い場合、リガンドに関する情報はほとんどなく、リガンドを推定することは困難であった。

オーファンG蛋白質共役型レセプターとして報告されているものの一つにSEN Rがある (Tal, M. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 209, 752-759, 1995)。SEN Rはソマトスタチンレセプター (SSTR4) と低いホモロジーがあるが、そのリガンドが何であるのかはこれまで不明であった。なお、Marchese, A. らによって報告されたGPR14 (Marchese, A., Genomics, 29, 335-344, 1995) はSEN Rと同一のレセプターである。

中枢神経系、循環器系、生殖系、免疫系、消化器、泌尿器系、感覚器官等で発現しているG蛋白質共役型レセプターであるSEN Rに対するリガンドは、医薬として有用であると考えられるが、これまでにその構造および機能については明らかにされていない。

#### 20 発明の開示

本発明者らは、SEN RをコードするcDNAを適当な手段で発現させた細胞を用い、特異的な細胞刺激 (シグナル伝達) 活性の測定等を指標に、該レセプター蛋白質がリガンドとして認識するポリペプチドをスクリーニングすること成功した。

さらに、本発明者らは、該活性因子であるリガンドと上記SEN Rとの結合性を変化させる化合物のスクリーニングを行なうことができることを見いだした。

すなわち、本発明は、

(1) 配列番号：14で表わされるアミノ酸配列と同一もしくはN末端にグル

タミン残基またはピログルタミン酸残基を有し配列番号：14で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、

(2) 実質的に同一のアミノ酸配列が配列番号：15、配列番号：27、配列番号：31、配列番号：32、配列番号：33または配列番号：34で表わされるアミノ酸配列である上記(1)記載のポリペプチド、

(3) 配列番号：14、配列番号：15、配列番号：27、配列番号：32、配列番号：33または配列番号：34で表わされるアミノ酸配列を有する上記(1)記載のポリペプチド、

(4) 上記(1)記載のポリペプチドの前駆体タンパク質またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、

(5) 配列番号：13または配列番号：26で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する上記(4)記載の前駆体タンパク質、

(6) 上記(1)記載のポリペプチドをコードする塩基配列を有するDNAを含有するDNA、

(7) 配列番号：16、配列番号：17、配列番号：28、配列番号：35、配列番号：36、配列番号：37または配列番号：38で表わされる塩基配列を有する上記(6)記載のDNA、

(8) 上記(4)記載の前駆体タンパク質をコードする塩基配列を有するDNAを含有するDNA、

(9) 配列番号：12または配列番号：25で表わされる塩基配列を有する上記(8)記載のDNA、

(10) 上記(6)または(8)記載のDNAを含有する組換えベクター、

(11) 上記(10)記載の組換えベクターで形質転換された形質転換体、

(12) 上記(11)記載の形質転換体を培養し、上記(1)記載のポリペプチドまたは上記(4)記載の前駆体タンパク質を生成、蓄積せしめ、これを取することを特徴とする上記(1)記載のポリペプチドまたは上記(4)記載の前駆体タンパク質またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の製



図3は合成ラットurotensin like peptide-2のCHO/rSEN細胞株に対するアラキドン酸代謝物遊離活性を示す。

発明を実施するための最良の形態

・ 本明細書において、「実質的に同一」とはタンパク質の活性、例えば、リガンドと受容体 (SEN R) の結合活性、生理的な特性などが、実質的に同じことを意味する。アミノ酸の置換、欠失、付加あるいは挿入はしばしばポリペプチドの生理的な特性や化学的な特性に大きな変化をもたらさないが、こうした場合その置換、欠失、付加あるいは挿入を施されたポリペプチドは、そうした置換、欠失、付加あるいは挿入のされていないものと実質的に同一であると考えられるであろう。該アミノ酸配列中のアミノ酸の実質的に同一な置換物としては、たとえばそのアミノ酸が属するところのクラスのうち他のアミノ酸類から選ぶことができる。非極性 (疎水性) アミノ酸としては、アラニン、ロイシン、イソロイシン、バリン、プロリン、フェニルアラニン、トリプトファン、メチオニンなどが挙げられる。極性 (中性) アミノ酸としてはグリシン、セリン、スレオニン、シス테인、チロシン、アスパラギン、グルタミンなどが挙げられる。陽電荷をもつ (塩基性) アミノ酸としてはアルギニン、リジン、ヒスチジンなどが挙げられる。負電荷をもつ (酸性) アミノ酸としては、アスパラギン酸、グルタミン酸などがあげられる。

本発明のポリペプチドは、SEN Rに対するリガンドであり、具体的には、配列番号：14で表されるアミノ酸配列と同一もしくはN末端にグルタミン残基またはピログルタミン酸残基を有し配列番号：14で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチド、そのアミド、そのエステルおよびそれらの塩など (以下、本発明のポリペプチドと略称する場合がある) があげられる。

本発明のポリペプチド、その製造法および用途を以下にさらに詳細に説明する。

本発明の上記ポリペプチドとしては、ヒトや温血動物 (例えば、モルモット、ラット、マウス、ブタ、ヒツジ、ウシ、サルなど) のあらゆる組織 (たとえ

ば、下垂体、膵臓、脳、腎臓、肝臓、生殖腺、甲状腺、胆のう、骨髄、副腎、皮膚、筋肉、肺、消化管、血管、心臓など) または細胞などに由来するポリペプチドであって、配列番号：14で表わされるアミノ酸配列と同一もしくはN末端にグルタミン残基またはピログルタミン酸残基を有し配列番号：14で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドであれば如何なるものであってもよい。例えば、本発明のポリペプチドとしては、配列番号：14で表わされるアミノ酸配列を含有するポリペプチド(他に、N末端にグルタミン残基またはピログルタミン酸残基を有し配列番号：14で表わされるアミノ酸配列を含有するポリペプチドと実質的に同質の活性を有するポリペプチド (例えば、配列番号：15、配列番号：27、配列番号：31、配列番号：32、配列番号：33または配列番号：34で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドなど) などが挙げられる。実質的に同質の活性としては、例えばレセプター結合活性、シグナル伝達活性などが挙げられる。実質的に同質とは、レセプター結合活性などが性質的に同質であることを示す。したがって、レセプター結合活性の強さなどの強弱、ポリペプチドの分子量などの量的要素は異なってもよい。

N末端にグルタミン残基またはピログルタミン酸残基を有し配列番号：14で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドとして具体的には、例えば、(1) ①N末端にグルタミン残基またはピログルタミン酸残基を有し、②配列番号：14で表されるアミノ酸配列のN末端から第8番目 (Ala) から第17番目 (Ile) までのアミノ酸配列を含有し、14～17個のアミノ酸残基からなるポリペプチドや (2) ①N末端にグルタミン残基またはピログルタミン酸残基を有し、②配列番号：14で表されるアミノ酸配列のN末端から第8番目 (Ala) から第17番目 (Ile) までのアミノ酸配列を含有し、③14～17個のアミノ酸残基からなるポリペプチドのN末端にさらに④3～10個のアミノ酸残基が付加されたポリペプチドなどがあげられる。

なかでも、配列番号：15、配列番号：27、配列番号：31、配列番号：32、配列番号：33または配列番号：34で表されるアミノ酸配列を含有す

るポリペプチドなどが好ましい例としてあげられる。

本明細書におけるポリペプチドはペプチド標記の慣例に従って左端がN末端(アミノ末端)、右端がC末端(カルボキシル末端)である。①配列番号：14で表されるアミノ酸配列、②配列番号：15で表されるアミノ酸配列、③配列番号：27で表されるアミノ酸配列、④配列番号：31で表されるアミノ酸配列、⑤配列番号：32で表されるアミノ酸配列、⑥配列番号：33で表されるアミノ酸配列、⑦配列番号：34で表されるアミノ酸配列などを含有するポリペプチドはC末端が通常カルボキシル基(-COOH)またはカルボキシレート(-COO<sup>-</sup>)であるが、C末端がアミド(-CONH<sub>2</sub>)またはエステル(-COOR)であってもよい。エステルのRとしては、例えばメチル、エチル、n-プロピル、イソブチルもしくはn-ブチルなどのC<sub>1-6</sub>アルキル基、シクロペンチル、シクロヘキシルなどのC<sub>3-6</sub>シクロアルキル基、フェニル、α-ナフチルなどのC<sub>6-10</sub>アリール基、ベンジル、フェネチル、ベンズヒドリルなどのフェニル-C<sub>1-3</sub>アルキル、もしくはα-ナフチルメチルなどのα-ナフチル-C<sub>1-3</sub>アルキルなどのC<sub>7-10</sub>アリール基のほか、経口用エステルとして汎用されるジバロイルオキシシメチル基などが挙げられる。

本発明のポリペプチドの塩としては、生理学的に許容される塩基(例えばアルカリ金属など)や酸(有機酸、無機酸)との塩が用いられるが、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。このような塩としては例えば無機酸(例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸)との塩、あるいは有機酸(例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、シュウ酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ペンゼンスルホン酸)との塩などが用いられる。

本発明のポリペプチドは、ヒトや温血動物の組織または細胞からポリペプチドを精製する方法によって製造することもできるし、後述のポリペプチド合成法に準じて製造することもできる。また、後述するポリペプチドをコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによっても製造することができる。

ヒトや温血動物の組織または細胞から製造する場合、ヒトや温血動物の組織

または細胞をホモジナイズした後、酸、有機溶媒などで抽出を行い、該抽出液を、塩析、透析、ゲル濾過、逆相クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィーなどのクロマトグラフィーを組み合わせることににより精製分離することができる。

上記したように本発明のポリペプチドは、自体公知のポリペプチドの合成に従って、あるいは本発明のポリペプチドを含有するポリペプチドを適当なブチダーゼで切断することによって製造することができる。ペプチドの合成法としては、例えば固相合成法、液相合成法のいずれによっても良い。すなわち、本発明のポリペプチドを構成し得る部分ペプチドもしくはアミノ酸と残余部分とを縮合させ、生成物が保護基を有する場合は保護基を脱離することにより目的のペプチドを製造することができる。公知の縮合方法や保護基の脱離としてはたとえば、以下の①～⑤に記載された方法が挙げられる。

- ①M. Bodanszky および M. A. Ondetti, ペプチド シンセシス (Peptide Synthesis), Interscience Publishers, New York (1966年)
- ②SchroederおよびLuebk, ザ ペプチド (The Peptide), Academic Press, New York (1965年)
- ③泉屋信夫他, ペプチド合成の基礎と実験, 丸善(株) (1975年)
- ④矢島治明 および榎原俊平, 生化学実験講座 1, タンパク質の化学IV, 205, (1977年)

⑤矢島治明監修, 続医薬品の開発 第14巻 ペプチド合成 広川書店

また、反応後は通常の精製法、たとえば、溶媒抽出・蒸留・カラムクロマトグラフィー・液体クロマトグラフィー・再結晶などを組み合わせて本発明のポリペプチドを精製分離することができる。上記方法で得られるポリペプチドが遊離体である場合は、公知の方法によって適当な塩に変換することができるし、逆に塩で得られた場合は、公知の方法によって遊離体に変換することができる。

ポリペプチドのアミド体は、アミド形成に適した市販のペプチド合成用樹脂を用いることができる。そのような樹脂としては例えば、クロロメチル樹脂、ヒドロキシメチル樹脂、ベンズヒドリルアミン樹脂、アミノメチル樹脂、4-

ベンジルオキシベンジルアルコール樹脂、4-メチルペンゼヒドリルアミン樹脂、PAN樹脂、4-ヒドロキシメチルメチルフェニルアセトアミドメチル樹脂、ポリアクリルアミド樹脂、4-(2',4'-ジメトキシフェニル)-ヒドロキシメチル)フェノキシ樹脂、4-(2',4'-ジメトキシフェニル)-Fmocアミノエチル)フェノキシ樹脂などを挙げることができる。このような樹脂を用い、 $\alpha$ -アミノ基と側鎖官能基を適当に保護したアミノ酸を、目的とするペプチドの配列通りに、自体公知の各種縮合方法に従い、樹脂上で縮合させる。反応の最後に樹脂からペプチドを切り出すと同時に各種保護基を除去し、必要に応じて高希釈溶液中で分子内スルフィド結合形成反応を実施し、目的のポリペプチドを取得する。

上記した保護されたアミノ酸の縮合に関しては、ペプチド合成に使用できる各種活性化試薬を用いることができるが、特に、カルボジイミド類がよい。カルボジイミド類としてはDCC、N,N'-ジイソプロピルカルボジイミド、N-エチル-N'-(3-ジメチルアルミノプロピル)カルボジイミドなどが挙げられる。これらによる活性化にはラセミ化抑制添加剤(例えば、HOBt、HOOBtなど)とともに保護されたアミノ酸を直接樹脂に添加するかまたは、対称酸無水物またはHOBtエステルあるいはHOOBtエステルとしてあらかじめ保護されたアミノ酸の活性化を行なったのちに樹脂に添加することができる。保護されたアミノ酸の活性化や樹脂との縮合に用いられる溶媒としては、ペプチド縮合反応に使用しうるものが知られている溶媒から適宜選択されうる。たとえばN、N-ジメチルホルムアミド、N、N-ジメチルアセトアミド、N-メチルピロリドンなどの酸アミド類、塩化メチレン、クロロホルムなどのハロゲン化炭化水素類、トリフルオロエタノールなどのアルコール類、ジメチルスルホキシドなどのスルホキシド類、ピリジンなどの三級アミン類、ジオキサソラン、テトラヒドロフランなどのエーテル類、アセトニトリル、プロピオニトリルなどのニトリル類、酢酸メチル、酢酸エチルなどのエステル類あるいはこれらの適宜の混合物などが用いられる。反応温度はペプチド結合形成反応に使用され得ることが知られている範囲から適宜選択され、通常約-20℃～50℃の範囲から適宜選択される。活性化されたアミノ酸誘導体は通常1、5ないし4倍過剰で用いられる。ニンヒドリ

ン反応を用いたテストの結果、縮合が不十分な場合には保護基の脱離を行うことなく縮合反応を繰り返すことにより十分な縮合を行うことができる。反応を繰り返しても十分な縮合が得られないときには、無水酢酸またはアセチルイミダゾールを用いて未反応アミノ酸をアセチル化して、後の反応に影響を及ぼさないようにすることができる。

原料アミノ酸のアミノ基の保護基としては、たとえば、Z、Boc、ターシャリ-ベンチルオキシカルボニル、イソボルニルオキシカルボニル、4-メチルペンジルオキシカルボニル、Cl-2、Br-2、アダマンチルオキシカルボニル、トリフルオロアセチル、フタロイル、ホルミル、2-ニトロフェニルスルフェニル、ジフェニルホスフィノチオイル、Fmocなどが挙げられる。カルボキシ基の保護基としては、たとえばRとして上記したC<sub>1-6</sub>アルキル基、C<sub>3-6</sub>シクロアルキル基、C<sub>7-14</sub>アラキル基の他、2-アダマンチル、4-ニトロベンジル、4-メトキシベンジル、4-クロロベンジル、フェナシル基およびベンジルオキシカルボニルヒドラジド、ターシャリ-ブトキシカルボニルヒドラジド、トリチルヒドラジドなどが挙げられる。

セリンおよびスレオニンの水酸基は、たとえばエステル化またはエーテル化によって保護することができる。このエステル化に適する基としては例えばアセチル基などの低級アルカノイル基、ベンゾイル基などのアロイル基、ベンジルオキシカルボニル基、エトキシカルボニル基などの炭素から誘導される基などが挙げられる。また、ニ-テル化に適する基としては、たとえばベンジル基、テトラヒドロピラニル基、ターシャリ-ブチル基などである。

チロシンのフェノール性水酸基の保護基としては、たとえばBzl、Cl<sub>3</sub>-Bzl、2-ニトロベンジル、Br-2、ターシャリ-ブチルなどが挙げられる。

ヒスチジンのイミダゾールの保護基としては、Tos、4-メトキシ-2,3,6-トリメチルベンゼンスルホニル、DNP、ベンジルオキシメチル、Bom、Boc、Trt、Fmocなどが挙げられる。

原料のカルボキシ基の活性化されたものとしては、たとえば対応する酸無水物、アジド、活性エステル[アルコール(たとえば、ペンタクロロフェノール、2,4,5-トリクロロフェノール、2,4-ジニトロフェノール、シアノメチルア

ルコール、パラニトロフェノール、HONB、N-ヒドロキシスクシミド、N-ヒドロキシフタルイミド、HOB(1) とのエステル] などが挙げられる。原料のアミノ基の活性化されたものとしては、たとえば対応するリン酸アミドが挙げられる。

保護基の除去(脱離)方法としては、たとえばpH黒あるいはpH炭素などの触媒の存在下での水素気流中での接触還元や、また、無水フッ化水素、メタンスルホン酸、トリフルオロメタンスルホン酸、トリフルオロ酢酸あるいはこれらの混合液などによる酸処理や、ジイソプロピルエチルアルミニウム、トリエチルアルミニウム、ピペリジン、ピペラジンなどによる塩基処理、また液体アンモニア中ナトリウムによる還元なども挙げられる。上記酸処理による脱離反応は一般に-20℃~40℃の温度で行われるが、酸処理においてはアニソール、フェノール、チオアニソール、メタクレゾール、パラクレゾール、ジメチルスルフィド、1,4-ブタンジチオール、1,2-エタンジチオールのようなカチオン捕捉剤の添加が有効である。また、ヒスチジンのイミダゾール保護基として用いられる2,4-ジニトロフェニル基はチオフェノール処理により除去され、トリプトファンのインドール保護基として用いられるホルミル基は上記の1,2-エタンジチオール、1,4-ブタンジチオールなどの存在下の酸処理による脱保護以外に、希水酸化ナトリウム、希アンモニアなどによるアルカリ処理によっても除去される。

原料の反応に関与すべきでない官能基の保護および保護基、ならびにその保護基の脱離、反応に関与する官能基の活性化などは公知の基あるいは公知の手段から適宜選択しうる。

ポリペプチドのアミド体を得る別の方法としては、まず、カルボキシル末端アミノ酸の $\alpha$ -カルボキシル基をアミド化した後、アミノ基側にペプチド鎖を所望の鎖長まで延ばした後、該ペプチド鎖のN末端の $\alpha$ -アミノ基の保護基のみを除いたペプチドとC末端のカルボキシル基の保護基のみを除いたペプチド(またはアミノ酸)とを製造し、この両ペプチドを上記したような混合溶媒中で縮合させる。縮合反応の詳細については上記と同様である。縮合により得られた保護ペプチドを精製した後、上記方法によりすべての保護基を除去し、所望の粗ポリペプチドを得ることができる。この粗ポリペプチドは既知の各種精製手段を駆使して精製し、主要画分を凍結乾燥することで所望のポリペプチド

のアミド体を得ることができる。

ポリペプチドのエステル体を得るにはカルボキシ末端アミノ酸の $\alpha$ -カルボキシル基を所望のアルコール類と縮合しアミノ酸エステルとした後、ポリペプチドのアミド体と同様にして所望のポリペプチドのエステル体を得ることができる。

本発明のポリペプチドとしては、上記した配列番号: 14 で表されるアミノ酸配列と同一もしくはN末端にグルタミン残基またはピログルタミン酸残基を有し配列番号: 14 で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有し、該ポリペプチドと同様の作用、例えば中枢神経機能調節作用、循環機能調節作用、心臓機能調節作用、腎臓機能調節作用、泌尿器機能調節作用または感覚器官機能調節作用などを有しているものであれば、どのようなポリペプチドであってもよい。

本発明のポリペプチドはさらに該ポリペプチドに対する抗体の調製のための抗原として用いることができる。このような抗原としてのポリペプチドは上記した本発明のポリペプチドの他に、上記本発明のポリペプチドのN末端ペプチド、C末端ペプチド、中央部分のペプチドなどの部分ペプチドなどが用いられる。

部分ペプチドとしては、個々のドメインを個別に含むペプチドも用い得るが、複数のドメインを同時に含む部分のペプチドでも良い。

本明細書における部分ペプチドもC末端がアミド(-CONH<sub>2</sub>)またはエステル(-COOR)であってもよい。ここでエステル基の例としては上記したポリペプチドの場合と同様である。該部分ペプチドがC末端以外にカルボキシル基またはカルボキシレートと有している場合、それらの基がアミド化またはエステル化されているものも本発明の部分ペプチドに含まれる。この時のエステルとしては、例えば、上記したC末端のエステルなどが用いられる。

本発明の部分ペプチドとして具体的には、例えば、配列番号: 14 で表されるアミノ酸配列のN末端から5番目(His)および6番目(Gly)を含有する2ないし16個のアミノ酸を含有するアミノ酸配列からなるペプチドなどがあげられる。





基配列中の1または2個以上（好ましくは1～30個程度、より好ましくは、1～10個程度、さらに好ましくは数個（1または2個））の塩基が挿入された塩基配列、④配列番号：16、配列番号：17、配列番号：28、配列番号：35、配列番号：36、配列番号：37または配列番号：38で表される塩基配列中の1または2個以上（好ましくは1～30個程度、より好ましくは、1～10個程度、さらに好ましくは数個（1または2個））の他の塩基で置換された塩基配列、または⑤それらを組み合わせた塩基配列を有するDNAを含むDNAなども含まれる。

より具体的には、(1)ストリンジェントな条件下で配列番号：14で表わされるアミノ酸配列と同一もしくはN末端にグルタミン残基またはピログルタミン残基を有し配列番号：14で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有するレセプター蛋白質に対する結合能を有するDNAを含有するDNAの有する配列とハイブリダイズする哺乳動物由来のDNA、(2)遺伝コードの縮重のため配列番号：14で表わされるアミノ酸配列と同一もしくはN末端にグルタミン残基またはピログルタミン酸残基を有し配列番号：14で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有するレセプター蛋白質に対する結合能を有するDNAを含有するDNAの有する配列および(1)に定められている配列とハイブリッド形成しないが、同一アミノ酸配列をもつポリペプチドをコードするDNAなどが用いられる。ハイブリダイゼーションは、自体公知の方法あるいはそれに準じた方法に従って行うことができる。上記ストリンジェントな条件としては、例えば42℃、50%ホルムアミド、4×SSPE(1×SSPE=150mM NaCl, 10mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, 1mM EDTA pH7.4)、5×デンハート溶液、0.1%SDSである。

配列番号：14で表わされるアミノ酸配列と同一もしくはN末端にグルタミン残基またはピログルタミン酸残基を有し配列番号：14で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質をコードするDNAを含有するDNAの有する配列とハイブリダイズするDNAとしては、例えば、5'末端から3塩基がCAAであり、配列番号：16で表される塩基配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、さらに好ましくは約90%以上、最

も好ましくは約95%以上の相同性を有する塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。

また、本発明の①配列番号：14で表されるアミノ酸配列などを含有するポリペプチドをコードするDNAの部分塩基配列を含有するDNA断片はDNA検出プローブとしても好ましく用いられる。

本発明のポリペプチドをコードするDNAは以下の遺伝子工学的手法にも製造することができる。

本発明のポリペプチドを完全にコードするDNAのクローニングの手段としては、本発明のポリペプチドの部分塩基配列を有する合成DNAプライマーを用いて自体公知のPCR法によって前記DNAライブラリー等から目的とするDNAを増幅するか、または適当なベクターに組み込んだDNAを例えば本発明のポリペプチドの一部あるいは全領域を有するDNA断片もしくは合成DNAを用いて標識したものとハイブリダイゼーションによって選別することができる。ハイブリダイゼーションの方法は、例えば Molecular Cloning (2nd ed. ; J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989) に記載の方法などに従って行われる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行う。

クローン化された本発明のポリペプチドをコードするDNAは目的によりそのまま、または所望により制限酵素で消化したり、リンカーを付加したりして使用することができる。該DNAはその5'末端側に翻訳開始コドンとしてATGを有し、また3'末端側には翻訳終止コドンとしてのTAA、TGAまたはTAGを有していてもよい。これらの翻訳開始コドンや翻訳終止コドンは、適当な合成DNAアダプターを用いて付加することもできる。

本発明のポリペプチドの発現ベクターは、例えば、(イ)本発明のポリペプチドをコードするDNAから目的とするDNA断片を切り出し、(ロ)該DNA断片を適当な発現ベクター中のプロモーターの下流に連結することにより製造することができる。

ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド（例、pBR322、pBR325、pUC12、pUC13）、枯草菌由来のプラスミド（例、pUB11

0. pTP5, pC194)、酵母由来プラスミド(例、pSH19, pSH15)、スファージなどのバクテリオファージ、レトロウイルス、ワクシニアウイルス、バキュロウイルスなどの動物ウイルスなどが用いられる。

5 本発明で用いられるプロモーターとしては、遺伝子の発現に用いる宿主に対して適切なプロモーターであればいかなるものでもよい。

形質転換する際の宿主が動物細胞である場合には、SV40由来のプロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロチオネインプロモーター、ヒートショックプロモーター、サイトメガロウイルスプロモーター、SR $\alpha$ プロモーターなどが利用できる。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、trpプロモーター、T7プロモーター、lacプロモーター、recAプロモーター、 $\lambda$ PLプロモーター、lppプロモーターなどが、宿主がバチルス属菌である場合は、SPO1プロモーター、SPO2プロモーター、penPプロモーターなど、宿主が酵母である場合は、PHO5プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADH1プロモーター、GALプロモーターなどが好ましい。宿主が昆虫細胞である場合は、ポリヘドリンプロモーター、P10プロモーターなどが好ましい。

発現ベクターには、以上の他に、所望によりエンハンサー、スプライシングシグナル、ポリA付加シグナル、選択マーカー、SV40複製オリジン(以下、SV40oriと略称する場合がある)などを含有しているものを用いることができる。選択マーカーとしては、例えば、ジヒドロ葉酸還元酵素(以下、dhfrと略称する場合がある)遺伝子(メソトレキセート(MTX)耐性)、アンピシリン耐性遺伝子(以下、Amp<sup>r</sup>と略称する場合がある)、ネオマイシン耐性遺伝子(以下、Neoと略称する場合がある、G418耐性)等が挙げられる。特に、CHO(dhfr<sup>-</sup>)細胞を用いてDHFR遺伝子を選択マーカーとして使用する場合、チミジンを含まない培地によっても選択できる。

また、必要に応じて、宿主に合ったシグナル配列を、ポリペプチドまたはその部分ペプチドのN末端側に付加する。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、phoA・シグナル配列、OmpA・シグナル配列などが、宿主がバチルス属菌である場合は、 $\alpha$ -アミラーゼ・シグナル配列、サブチリシン・シグナル配列な

どが、宿主が酵母である場合は、メイテイングファクター $\alpha$ (MF $\alpha$ )・シグナル配列、インベルターゼ・シグナル配列など、宿主が動物細胞である場合には、例えばインシュリン・シグナル配列、 $\alpha$ -インターフェロン・シグナル配列、抗体分子・シグナル配列などがそれぞれ利用できる。

5 このようにして構築されたポリペプチドをコードするDNAを含有するベクターを用いて、形質転換体を製造することができる。

宿主としては、たとえばエシェリヒア属菌、バチルス属菌、酵母、昆虫は昆虫細胞、動物細胞などが用いられる。

10 エシェリヒア属菌としては、エシェリヒア・コリ(*Escherichia coli*) K12・DH1(プロシージングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ザ・ユエスエー(Proc. Natl. Acad. Sci. USA)、60巻、160(1968))、JM103(ヌクレック・アシズ・リサーチ、(Nucleic Acids Research)、9巻、309(1981))、JA221(ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー(Journal of Molecular Biology))、120巻、517(1978))、HB101(ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー、41巻、459(1969))、C600(ジェネティクス(Genetics)、39巻、440(1954))などが用いられる。

15 バチルス属菌としては、たとえばバチルス・サチルス(*Bacillus subtilis*) M114(ジーン、24巻、255(1983))、207-21(ジャーナル・オブ・バイオケミストリー(Journal of Biochemistry)、95巻、87(1984))などが用いられる。

酵母としては、たとえばサッカロマイセス セレビスエ(*Saccharomyces cerevisiae*) AH22, AH22R<sup>-</sup>, NA87-11A, DKD-5D、20 B-12などが用いられる。

25 昆虫としては、例えばカイコの幼虫などが用いられる(前田ら、ネイチャー(Nature)、315巻、592(1985))。

昆虫細胞としては、例えば、ウイルスがACNPVの場合は、夜盗蛾の幼虫由来株化細胞(*Spodoptera frugiperda* cell; Sf細胞)、*Trichoplusia ni*の中間由来のMG1細胞、*Trichoplusia ni*の卵由来のHigh Five<sup>TM</sup>細胞、*Mamestra*

brassicae由来の細胞または*Estigmene acrea*由来の細胞などが用いられる。ウ  
イルスがBmNPVの場合は、蚕由来株化細胞 (Bombyx mori N; BmN細胞)  
などが用いられる。該Sf細胞としては、例えば、Sf9細胞 (ATCC CRL1711  
)、Sf21細胞 (以上、Vaughn, J.L.ら、イン・ヴィトロ (in Vitro), 1  
3巻, 213-217頁 (1977年)) などが用いられる。

動物細胞としては、たとえばサルCOS-7細胞、Vero細胞、チャイニーズ  
ハムスター細胞CHO、DHFR遺伝子欠損チャイニーズハムスター細胞CH  
O (dhfr<sup>-</sup>CHO細胞)、マウスL細胞、マウス3T3細胞、マウスミエロ  
ーマ細胞、ヒトHEK293細胞、ヒトFL細胞、293細胞、C127細胞  
、BALB3T3細胞、Sp-2/O細胞などが用いられる。

エシェリヒア属菌を形質転換するには、たとえばプロシーディングズ・オブ・  
ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユエスエ  
ー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 69巻, 2110 (1972)やジーン  
(Gene), 17巻, 107 (1982)などに記載の方法に従って行なわれる。  
バチルス属菌を形質転換するには、たとえばモレキュラー・アンド・ジェネ  
ラル・ジェネティクス (Molecular & General Genetics), 168巻, 11  
1 (1979)などに記載の方法に従って行われる。

酵母を形質転換するには、たとえばプロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナ  
ル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユエスエー (Proc. Natl.  
Acad. Sci. USA), 75巻, 1929 (1978)に記載の方法に従って行な  
われる。

昆虫細胞または昆虫を形質転換するには、たとえばバイオ/テクノロジー (Bio/Technology), 6巻, 47-55頁 (1988年) などに記載の方法に従っ  
て行なわれる。

動物細胞を形質転換するには、たとえばヴィロロジー (Virology), 52巻  
, 456 (1973)に記載の方法に従って行なわれる。

発現ベクターの細胞への導入方法としては、例えば、リポフェクション法 (Felgner, P.L. et al., プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユエスエー (Proceedings of the National

Academy of Sciences of the United States of America), 84巻, 7413  
頁 (1987年))、リン酸カルシウム法 (Graham, F. L. and van der Eb, A.  
J. ヴィロロジー (Virology), 52巻, 456-467頁 (1973年))、  
電気穿孔法 (Nuenemann, E. et al., エンボ・ジャーナル (EMBO J.), 1巻, 8  
41-845頁 (1982年)) 等が挙げられる。

このようにして、本発明のポリペプチドをコードするDNAを含有する発  
ベクターで形質転換された形質転換体を得られる。

なお、動物細胞を用いて、本発明のポリペプチドを安定に発現させる方法と  
しては、上記の動物細胞に導入された発現ベクターが染色体に組み込まれた細  
胞をクローン選択によって選択する方法がある。具体的には、上記の選択マー  
カーを指標にして形質転換体を選択する。さらに、このように選択マーカ  
ーを用いて得られた動物細胞に対して、繰り返しクローン選択を行なうことにより  
本発明のポリペプチドの高発現能を有する安定な動物細胞株を得ることができ  
る。また、dhfr遺伝子を選択マーカーとして用いた場合、MTX濃度を徐  
々に上げて培養し、耐性株を選択することにより、dhfr遺伝子とともに、  
本発明のポリペプチドまたはその部分ペプチドをコードするDNAを細胞内で  
増幅させて、さらに高発現の動物細胞株を得ることができる。

上記の形質転換体の本発明のポリペプチドをコードするDNAが発現可能な  
条件下で培養し、本発明のポリペプチドを生成、蓄積せしめることによって、  
本発明のポリペプチドを製造することができる。

宿主がエシェリヒア属菌、バチルス属菌である形質転換体を培養する際、培  
養に使用される培地としては液体培地が適当であり、その中には該形質転換体  
の生育に必要な炭素源、窒素源、無機物その他が含ませしめられる。炭素源と  
しては、たとえばグルコース、デキストリン、可溶性澱粉、ショ糖など、窒素  
源としては、たとえばアンモニウム塩類、硝酸塩類、コリンチン・リカー  
、ペプトン、カゼイン、肉エキス、大豆粕、バレイショ抽出液などの無機また  
は有機物質、無機物としてはたとえば塩化カルシウム、リン酸二水素ナトリウ  
ム、塩化マグネシウムなどが挙げられる。また、酵母、ビタミン類、生長促進  
因子などを添加してもよい。培地のpHは約5〜8が望ましい。

エシェリヒア属菌を培養する際の培地としては、例えばグルコース、カザミン酸を含むM9培地〔ミラー (Miller), ジャーナル・オブ・エクスペリメンツ・イン・モレキュラー・ジェネティクス (Journal of Experiments in Molecular Genetics), 431-433, Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1972〕が好ましい。ここに必要によりプロモーターを効率よく動かせるために、たとえば3β-インドールアクリル酸のような薬剤を加えることができる。

宿主がエシェリヒア属菌の場合、培養は通常約15〜43℃で約3〜24時間行い、必要により、通気や攪拌を加えることもできる。

宿主がバチルス属菌の場合、培養は通常約30〜40℃で約6〜24時間行ない、必要により通気や攪拌を加えることもできる。

宿主が酵母である形質転換体を培養する際、培地としては、たとえばバークホルダー (Burkholder) 最小培地 (Boslian, K. L., 「プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス」・オブ・ザ・ユエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 77巻, 4505 (1980)) や0.5%カザミノ酸を含有するSD培地 [Billar, G. A., 「プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス」・オブ・ザ・ユエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 81巻, 5330 (1984)] が挙げられる。培地のpHは約5〜8に調整するのが好ましい。培養は通常約20℃〜35℃で約24〜72時間行い、必要に応じて通気や攪拌を加える。

宿主が昆虫細胞である形質転換体を培養する際、培地としては、Grace's Insect Medium (Grace, T. C. C., ネイチャー (Nature), 195, 788 (1962)) に非動化した10%ウシ血清等の添加物を適宜加えたものなどが用いられる。培地のpHは約6.2〜6.4に調整するのが好ましい。培養は通常約27℃で約3〜5日間行い、必要に応じて通気や攪拌を加える。

宿主が動物細胞である形質転換体を培養する際、培地としては、たとえば約5〜20%の胎児牛血清を含むMEM培地 (サイエンス (Science), 122巻, 501 (1952))、DMEM培地 (ウイルス学 (Virology), 8巻, 3

96 (1959))、RPMI 1640培地 (ジャーナル・オブ・ザ・アメリカン・メディカル・アソシエーション (The Journal of the American Medical Association) 199巻, 519 (1967))、199培地 (プロシーディング・オブ・ザ・ソサイエティ・フォー・ザ・バイオロジカル・メディシン (Proceeding of the Society for the Biological Medicine), 73巻, 1 (1950))などが用いられる。pHは約6〜8であるのが好ましい。培養は通常約30℃〜40℃で約15〜60時間行い、必要に応じて通気や攪拌を加える。

特にCHO (dhfr-) 細胞およびdhfr遺伝子を選択マーカーとして用いる場合には、チミジンをほとんど含まない透析ウシ胎児血清を含むDMEM培地を用いるのが好ましい。

上記培養物から本発明のポリペプチドを分離精製するには、例えば下記の方法により行なうことができる。

本発明のポリペプチドを培養菌体あるいは細胞から抽出する際には、培養後、公知の方法で菌体あるいは細胞を集め、これを適当な緩衝液に懸濁し、超音波、リゾチームおよび/または凍結融解などによって菌体あるいは細胞を破壊したのち、遠心分離やろ過によりポリペプチドの粗抽出液を得る方法などが適宜用い得る。緩衝液の中に尿素や塩酸グアニジンなどのたんぱく変性剤や、トリトンX-100 (登録商標。以下、TMと省略することがある。) などの界面活性剤が含まれていてもよい。

培養液中にポリペプチドが分泌される場合には、培養終了後、自体公知の方法で菌体あるいは細胞と上清とを分離し、上清を集める。

このようにして得られた培養上清、あるいは抽出液中に含まれる本発明のポリペプチドの精製は、自体公知の分離・精製法を適切に組み合わせて行なうことができる。これらの公知の分離・精製法としては、塩析や溶媒沈殿法などの溶解度を利用する方法、透析法、限外ろ過法、ゲルろ過法、およびSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法などの主として分子量の差を利用する方法、

イオン交換クロマトグラフィーなどの荷電の差を利用する方法、アフィニティークロマトグラフィーなどの特異的親和性を利用する方法、逆相高速液体クロマトグラフィーなどの疎水性の差を利用する方法、等電点電気泳動法やクロマ

トフォォーカシングなどの等電点の差を利用する方法などが用いられる。

かくして得られる本発明のポリペプチドが遊離体で得られた場合には、自体公知の方法あるいはそれに準じる方法によって塩に変換することができ、逆に塩で得られた場合には自体公知の方法あるいはそれに準じる方法により、遊離体または他の塩に変換することができる。

なお、組換え体が産生する本発明のポリペプチドを、精製前または精製後に適当な蛋白修飾酵素を作用させることにより、任意に修飾を加えたり、ポリペプチドを部分的に除去することもできる。蛋白修飾酵素としては、例えば、トリプシン、キモトリプシン、アルギニルエンドペプチダーゼ、プロテインキナーゼ、グリコシダーゼなどが用いられる。

かくして生成する本発明のポリペプチドの存在は特異抗体を用いたエンザイムイムノアッセイなどにより測定することができる。

本発明のポリペプチドをコードするDNAまたは本発明のポリペプチドは、①本発明のポリペプチドの有する生理作用の探索、②合成オリゴヌクレオチドプローブあるいはPCRのプライマーの作成、③SENRのリガンドや前駆体蛋白質をコードするDNAの入手、④組換え型レセプター蛋白質の発現系を用いたレセプター結合アッセイ系の開発と医薬品候補化合物のスクリーニング、⑤抗体および抗血清の入手、⑥DNA、RNA、抗体または抗血清を用いた診断薬の開発、⑦中枢神経機能調節剤、循環機能調節剤、心臓機能調節剤、腎臓機能調節剤、泌尿器機能調節剤、感覚器官機能調節剤などの医薬の開発、⑧遺伝子治療等に用いることができる。

特に、後述の組換え型SENRの発現系を用いたレセプター結合アッセイ系によって、ヒトなどの温血動物に特異的なSENRアゴニストまたはアンタゴニストをスクリーニングすることができ、該アゴニストまたはアンタゴニストを各種疾病の予防・治療剤などとして使用することができる。

さらに、上記⑦に関し、本発明のポリペプチドまたはそれをコードするDNAは中枢神経系、循環器系、心臓、腎臓、泌尿器系または感覚器官系などで発現しているSENRがリガンドとして認識するものであるので、安全で低毒性な医薬として有用である。本発明のポリペプチドまたはそれをコードするDN

Aは中枢神経機能調節作用、循環機能調節作用、心臓機能調節作用、腎臓機能調節作用、泌尿器機能調節作用あるいは感覚器官調節作用などに関与していることから、たとえば老人性痴呆、脳血管性痴呆、系統変成型の退行変成疾患（例：アルツハイマー病、パーキンソン病、ピック病、ハンチントン病など）に起因する痴呆、高（低）血圧症、腎疾患（例：慢性腎不全、腎炎など）、心疾患（例：心不全、急性心筋梗塞など）、頻尿、尿失禁、難聴、嗅覚異常、視覚異常などの疾病の治療・予防剤として用いることができる。

本発明のポリペプチドまたはそれをコードするDNAを上述の医薬として使用する場合、常套手段に従って実施することができる。例えば、必要に応じて糖衣や腸溶性被膜を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤などとして経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、または懸濁液剤などの注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、該化合物またはその塩を生理学的に認められる担体、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤などとともに一般に認められた製薬実施に要求される単位用量形態で混和することによって製造することができる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な用量が得られるようにするものである。

本発明のDNAを用いる場合は、該DNAを単独またはレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノウイルスアソシエーテッドウイルスクターなどの適当なベクターに挿入した後、常套手段に従って実施することができる。

錠剤、カプセル剤などに混和することができる添加剤としては、例えばゼラチン、コーンスターチ、トラガントガム、アラビアガムのような結合剤、結晶性セルロースのような賦形剤、コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸などのような膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖またはサッカリンのような甘味剤、ペパーミント、アカモノ油またはチエリーのような香味剤などが用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、前記タイプの材料にさらに油脂のような液状担体を含有することができる。注射のための無菌組成物は注射用水のようなベヒクル中の活性物質、胡麻油、椰子油

などのような天然産出植物油などを溶解または懸濁させるなどの通常の製剤実施にしたがって処方することができる。

注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液（例えば、D-ソルビトール、D-マンニトール、塩化ナトリウムなど）などがあげられ、適当な溶解補助剤、たとえばアルコール（たとえばエタノール）、ポリアルコール（たとえばプロピレングリコール、ポリエチレングリコール）、非イオン性界面活性剤（たとえばポリソルベート 80 (TM)、HCO-50）などと併用してもよい。油性液としてはゴマ油、大豆油などがあげられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジアルアルコールなどと併用してもよい。

また、緩衝剤（例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液）、無痛化剤（例えば、塩化ベンゼンコニコウム、塩酸プロカインなど）、安定剤（例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールなど）、保存剤（例えば、ベンジアルアルコール、フェノールなど）、酸化防止剤などと配合してもよい。調製された注射液は通常、適当なアンブルに充填される。

このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えばヒトや哺乳動物（例えば、マウス、ラット、モルモット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して投与することができる。

本発明のポリペプチドまたはそれをコードするDNAの投与量は、症状などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に成人（体重 60 kg として）においては、一日につき約 0.1 から 100 mg、好ましくは約 1.0 から 50 mg、より好ましくは約 1.0 から 20 mg である。非経口的に投与する場合は、その 1 回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、たとえば注射剤の形では成人の心不全患者（体重 60 kg として）への投与においては、一日につき約 0.01 から 30 mg 程度、好ましくは約 0.1 から 20 mg 程度、より好ましくは約 0.1 から 10 mg 程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60 kg 当量に換算した量を投与することができる。

本発明のポリペプチドの前駆体タンパク質、その製造法および用途を以下に

さらに詳細に説明する。

本発明の上記ポリペプチドの前駆体タンパク質、そのアミド、そのエステルまたはその塩（以下、本発明の前駆体タンパク質と称する場合がある）としては、例えば、前記した本発明のタンパク質の N 末端または（おおよび）C 末端に 1 個または 2 個以上、好ましくは 1~200 個程度、より好ましくは 1~120 個程度、さらに好ましくは 50~120 個程度のアミノ酸が結合したタンパク質である。

具体的には、本発明の前駆体タンパク質は、配列番号：13 または配列番号：26 で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を有するタンパク質などが用いられる。

より具体的には、配列番号：13 で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を有するタンパク質は配列番号：14、配列番号：15、配列番号：31 または配列番号：32 で表わされるアミノ酸配列を有するポリペプチドの前駆体の例として、配列番号：26 で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を有するタンパク質は配列番号：27、配列番号：33 または配列番号：34 で表わされるアミノ酸配列を有するポリペプチドの前駆体の例としてあげられる。

また、本発明の前駆体タンパク質は、ヒトや温血動物（例えば、モルモット、ラット、マウス、ブタ、ヒツジ、ウシ、サルなど）のあらゆる組織（たとえば、下垂体、膵臓、脳、腎臓、肝臓、生殖腺、甲状腺、胆のう、骨髄、副腎、皮膚、筋肉、肺、消化管、血管、心臓など）または細胞などに由来するタンパク質であって、配列番号：13 または配列番号：26 で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を有するタンパク質であれば如何なるものであってもよい。実質的に同質の活性としては、例えばレセプター結合活性、シグナル伝達活性などが挙げられる。実質的に同質とは、レセプター結合活性などが性質的に同質であることを示す。したがって、レセプター結合活性の強さなどの強弱、タンパク質の分子量などの量的要素は異なってもよい。

配列番号：13 または配列番号：26 で表わされるアミノ酸配列と実質的に



同一のアミノ酸配列として具体的には、配列番号：13または配列番号：26で表わされるアミノ酸配列と約50%以上、好ましくは約60%以上、さらに好ましくは約70%以上、より好ましくは約80%以上、特に好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有するアミノ酸配列を示す。

また、本発明の前駆体タンパク質としては、例えば、①配列番号：13または配列番号：26で表わされるアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは1〜30個程度、好ましくは、1〜10個程度、さらに好ましくは数個（1または2個））のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、②配列番号：13または配列番号：26で表わされるアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは1〜30個程度、好ましくは、1〜10個程度、さらに好ましくは数個（1または2個））のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、③配列番号：13または配列番号：26で表わされるアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは1〜30個程度、好ましくは、1〜10個程度、さらに好ましくは数個（1または2個））のアミノ酸が挿入されたアミノ酸配列、④配列番号：13または配列番号：26で表わされるアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは1〜30個程度、好ましくは、1〜10個程度、さらに好ましくは数個（1または2個））のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、または⑤それらを組み合わせたアミノ酸配列を含有するタンパク質なども含まれる。

本明細書における前駆体タンパク質はペプチド標記の慣例に従って左端がN末端（アミノ末端）、右端がC末端（カルボキシル末端）である。例えば、配列番号：13または配列番号：26で表わされるアミノ酸配列で表されるアミノ酸配列などを含有する本発明の前駆体タンパク質は通常カルボキシル基（-COOH）またはカルボキシレート（-COO<sup>-</sup>）であるが、C末端がアミド（-CONH<sub>2</sub>）またはエステル（-COOR）であってもよい。エステルのRとしては、例えばメチル、エチル、n-プロピル、イソプロピルもしくはn-ブチルなどのC<sub>1-6</sub>アルキル基、シクロペンチル、シクロヘキシルなどのC<sub>3-6</sub>シクロアルキル基、フェニル、 $\alpha$ -ナフチルなどのC<sub>6-12</sub>アリール基、ベンジル、フェネチル、ベンズヒドリルなどのフェニル-C<sub>1-2</sub>アルキル、もしくは $\alpha$ -ナフチルメルなどの

$\alpha$ -ナフチル-C<sub>1-3</sub>アルキルなどのC<sub>7-14</sub>アラルキル基のほか、経口用エスデルとして汎用されるピバロイルオキシメチル基などが挙げられる。

本発明の前駆体タンパク質の塩としては、例えば、上記の本発明のポリペプチドの塩として例示したものと同様のものなどがあげられる。

5 本発明の前駆体タンパク質は、ヒトや温血動物の組織または細胞からタンパク質を精製する方法によって製造することもできるし、後述のタンパク質法に準じて製造することもできる。また、後述するタンパク質をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによっても製造することができる。

10 ヒトや温血動物の組織または細胞から製造する場合、ヒトや温血動物の組織または細胞をホモジナイズした後、酸、酸、有機溶媒などで抽出を行い、該抽出液を、塩析、透析、ゲル濾過、逆相クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィーなどのクロマトグラフィーを組み合わせてることにより精製分離することができる。

15 上記のように本発明の前駆体タンパク質は、自体公知のタンパク質の合成法に従って、あるいは本発明のタンパク質を含有するタンパク質を適当なペプチドで切断することによって製造することができる。ペプチドの合成法としては、上記と同様の方法などが用いられる。

20 本発明の前駆体タンパク質のアミド体は、アミド形成に適した市販のペプチド合成用樹脂を用いることができる。そのような樹脂としては例えば、上ペプチド合成用樹脂などが用いられる。このような樹脂を用い、 $\alpha$ -アミノ基と側鎖官能基を適当に保護したアミノ酸を、目的とするペプチドの配列通りに、自体公知の各種縮合方法に従い、樹脂上で縮合させる。反応の最後に樹脂からペプチドを切り出すと同時に各種保護基を除去し、必要に応じて高希釈溶液中で分子内ジスルフィド結合形成反応を実施し、目的の本発明の前駆体タンパク質を取得する。

25 本発明の前駆体タンパク質としては、上記した配列番号：13または配列番号：26で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有し、該本発明のポリペプチド質と同様の作用、例えば中枢神経機能調節作用、循環機能調節作用、心臓機能調節作用、腎臓機能調節作用、泌尿器機能



調節作用または感覚器官機能調節作用などを前駆体タンパク質自身が有しているものであってよい。

本発明の前駆体タンパク質はさらに該前駆体タンパク質に対する抗体の調製のための抗原として用いることができる。このような抗原としてのタンパク質は上記した本発明の前駆体タンパク質の他に、上記本発明の前駆体タンパク質のN末端ペプチド、C末端ペプチド、中央部分のペプチドなどの部分ペプチドなどが用いられる。

部分ペプチドとしては、個々のドメインを個別に含むペプチドも用い得るが、複数のドメインを同時に含む部分のペプチドでも良い。

本発明の前駆体タンパク質の部分ペプチドの塩としては、前述の本発明のポリペプチドの塩と同様のものが用いられる。

本発明の前駆体タンパク質の部分ペプチドまたはそのアミド、エステルもしくはその塩は、上記した前駆体タンパク質の場合と同様の合成法に従って、あるいは本発明の前駆体タンパク質を適当なペプチダーゼで切断することによって製造することができる。

本発明の前駆体タンパク質をコードするDNAとしては、配列番号：13または配列番号：26で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質をコードするDNAを含有するDNAであり、例えば、ゲノムDNA、cDNA、前記した組織・細胞由来のcDNAライブラリー、合成DNAのいずれでもよい。ライブラリーに使用するベクターはバクテリオファージ、プラスミド、コスミド、ファージミドなどいずれであってよい。また、前記した組織・細胞よりRNA画分を調製したものをを用いて直接Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (以下、RT-PCR法と略称する)によって増幅することもできる。

ここで、配列番号：13または配列番号：26で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質をコードするDNAを含有するDNAとしては、例えば、配列番号：12または配列番号：25で表わされる塩基配列を有するDNAを含有するDNAなどがあげられる他

、配列番号：12または配列番号：25で表わされる塩基配列と約50%以上、好ましくは約60%以上、さらに好ましくは約70%以上、より好ましくは約80%以上、特に好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有する塩基配列を有するDNAを含有するDNAなどがあげられる。

また、配列番号：13または配列番号：26で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質をコードするDNAを含有するDNAとしては、例えば、①配列番号：12または配列番号：25で表わされる塩基配列中の1または2個以上（好ましくは1～30個程度、好ましくは、1～10個程度、さらに好ましくは数個（1または2個））の塩基が欠失した塩基配列、②配列番号：12または配列番号：25で表わされる塩基配列中の1または2個以上（好ましくは1～30個程度、好ましくは、1～10個程度、さらに好ましくは数個（1または2個））の塩基が付加した塩基配列、③配列番号：12または配列番号：25で表わされる塩基配列中の1または2個以上（好ましくは1～30個程度、好ましくは、1～10個程度、さらに好ましくは数個（1または2個））の塩基が挿入された塩基配列、④配列番号：12または配列番号：25で表わされる塩基配列中の1または2個以上（好ましくは1～30個程度、好ましくは、1～10個程度、さらに好ましくは数個（1または2個））の塩基が他の塩基で置換されたアミノ酸配列、または⑤それらを組み合わせた塩基配列を有するDNAを含有するDNAなども含まれる。

より具体的に、(1)ストリンジェントな条件下で配列番号：13または配列番号：26で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質をコードするDNAを含有するDNAの有する配列とハイブリダイズする哺乳動物由来のDNA、(2)遺伝コードの縮重のため配列番号：13または配列番号：26で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質をコードするDNAを含有するDNAの有する配列および(1)に定められている配列とハイブリッド形成しないが、同一アミノ酸配列をもつタンパク質をコードするDNAなどが用いられる。ハイブリダイゼーションは、自体公知の方法あるいはそれに準じた方

法に従って行うことができる。上記ストリンジエントな条件としては、例えば 4℃、50%ホルムアミド、4×SSPE(1×SSPE=150mM NaCl, 10mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 1mM EDTA pH7.4)、5×デンハート溶液、0.1%SDSである。

5 配列番号：13または配列番号：26で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質をコードするDNAを含有するDNAの有する配列とハイブリダイズするDNAとしては、例えば、配列番号：12または配列番号：25で表される塩基配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、さらに好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有する塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。

10 また、本発明の配列番号：13または配列番号：26で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質をコードするDNAの部分塩基配列を含有するDNA断片はDNA検出プローブとしても好ましく用いられる。

15 本発明の前駆体タンパク質をコードするDNAは上記した本発明のポリペプチドと同様にして遺伝子工学的手法によっても製造することができる。

本発明の前駆体タンパク質をコードするDNAまたは本発明の前駆体タンパク質は、①本発明の前駆体タンパク質（または本発明のポリペプチド）の有する生理作用の探索、②合成オリゴヌクレオチドプローブあるいはPCRのプライマーの作成、③本発明のポリペプチドをコードするDNAの入手、④組換え型レセプター蛋白質の発現系を用いたレセプター結合アッセイ系の開発と医薬品候補化合物のスクリーニング、⑤抗体および抗血清の入手、⑥DNA、RNA、抗体または抗血清を用いた診断薬の開発、⑦中枢神経機能調節剤、循環機能調節剤、心臓機能調節剤、腎臓機能調節剤、泌尿器機能調節剤、感覚器官機能調節剤などの医薬の開発、⑧遺伝子治療等に用いることができる。

25 特に、後述の組換え型SENRの発現系を用いたレセプター結合アッセイ系によって、ヒトなどの温血動物に特異的なSENRアゴニストまたはアンタゴニストをスクリーニングすることができ、該アゴニストまたはアンタゴニストを各種疾病の予防・治療剤などとして使用することができる。

さらに、上記⑦に関し、本発明の前駆体タンパク質またはそれをコードするDNAは中枢神経系、循環器系、心臓、腎臓、泌尿器系または感覚器官系などで発現しているSENRがリガンドとして認識するものであるので、安全で低毒性な医薬として有用である。本発明の前駆体タンパク質またはそれをコードするDNAは中枢神経機能調節作用、循環機能調節作用、心臓機能調節作用、腎臓機能調節作用、泌尿器機能調節作用あるいは感覚器官調節作用などに用いていることから、たとえば老人性痴呆、脳血管性痴呆、系統変成型の退行変成疾患（例：アルツハイマー病、パーキンソン病、ピック病、ハンチントン病など）に起因する痴呆、高（低）血圧症、腎疾患（例：慢性腎不全、腎炎など）、心疾患（例：心不全、急性心筋梗塞など）、頻尿、尿失禁、難聴、嗅覚異常、視覚異常などの疾病の治療・予防剤として用いることができる。

本発明の前駆体タンパク質またはそれをコードするDNAを上記の医薬として使用する場合、常套手段に従って実施することができる。例えば、必要に応じて糖衣や腸溶性被膜を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤などとして経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、または懸濁液剤などの注射剤の形で経口的に使用できる。例えば、該化合物またはその塩を生理学的に認められる担体、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤などとともに一般に認められた製剤実施に要求される単位用量形態で混和することによって製造することが得られる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な用量が得られるようにするものである。

錠剤、カプセル剤などに混和することができる添加剤としては、上記の添加剤と同様のものなどを用いることができる。

25 注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液（例えば、D-ソルビトール、D-マンニトール、塩化ナトリウムなど）などがあげられ、適当な溶解補助剤、たとえばアルコール（たとえばエタノール）、ポリアルコール（たとえばプロピレングリコール、ポリエチレングリコール）、非イオン性界面活性剤（たとえばポリソルベート80 (TM)、HCO-50）などと併用してもよい。油性液としてはゴマ油、大豆油など

があげられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどと併用してもよい。

また、緩衝剤（例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液）、無痛化剤（例えば、塩化ベンゼンアルコール、塩酸プロカインなど）、安定剤（例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールなど）、保存剤（例えば、ベンジルアルコール、フェノールなど）、酸化防止剤などと配合してもよい。調製された注射液は通常、適当なアンブルに充填される。

このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えばヒトや哺乳動物（例えば、マウス、ラット、モルモット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して投与することができる。

本発明の前駆体タンパク質またはそれをコードするDNAの投与量は、症状などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に成人（体重60kgとして）においては、一日につき約0.1から100mg、好ましくは約1.0から50mg、より好ましくは約1.0から20mgである。非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、たとえば注射剤の形では成人の心不全患者（体重60kgとして）への投与においては、一日につき約0.01から30mg程度、好ましくは約0.1から20mg程度、より好ましくは約0.1から10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kg当たりに換算した量を投与することができる。

本発明のポリペプチド、その前駆体タンパク質、該ポリペプチドまたは前駆体タンパク質をコードするDNAおよび抗体などの用途について、以下に具体的に説明する。

#### (1) ポリペプチド欠乏症の予防・治療剤

SENRに対して本発明のポリペプチドおよびその前駆体タンパク質が有する作用に応じて、本発明のポリペプチドをコードするDNAをポリペプチドまたはSENR欠乏症の予防・治療剤としても使用することができる。

例えば、生体内において、本発明のポリペプチド、その前駆体タンパク質またはSENRが減少しているためにリガンドの生理作用（中枢神経機能調節作

用、循環機能調節作用、心臓機能調節作用、腎臓機能調節作用、泌尿器機能調節作用あるいは感覚器官機能調節作用など）が期待できない患者がいる場合に、(イ) 本発明のポリペプチドまたはその前駆体タンパク質をコードするDNAを該患者に投与し発現させることによって、あるいは(ロ) 脳細胞などに本発明のポリペプチドまたはその前駆体タンパク質をコードするDNAを挿入し発現させた後に、該脳細胞を該患者に移植することなどによって、該患者の脳細胞におけるポリペプチドまたはその前駆体タンパク質の量を増加させる。ポリペプチドまたはその前駆体タンパク質の作用を充分に発揮させることができる。したがって、本発明のポリペプチドまたはその前駆体タンパク質をコードするDNAは、安全で低毒性なポリペプチドまたはその前駆体タンパク質の欠乏症の予防・治療剤などとして用いることができる。

上記DNAを上記治療剤として使用する場合は、該DNAを単独あるいはトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノウイルスアソシエテッドウイルスベクターなどの適当なベクターに挿入した後、上記した本発明のポリペプチドまたはその前駆体タンパク質もしくはそれらの部分ペプチドをコードするDNAを医薬品として使用する場合と同様の手段に従って実施することができる。

#### (2) ポリペプチドに対するSENRの定量法

本発明のポリペプチドまたはその前駆体タンパク質はSENRまたはその塩や該セプター蛋白質の部分ペプチドまたはその塩に対して結合性を有している。生体内におけるSENRもしくはその塩、または該SENRのポリペプチドまたはその塩の濃度を感度良く定量することができる。

この定量法は、例えば競合法と組み合わせることによって用いることができる。すなわち、被検体を本発明のポリペプチドまたはその前駆体タンパク質と接触させることによって被検体中のSENRもしくはその塩、またはSENRの部分ペプチドもしくはその塩の濃度を測定することができる。

具体的には、例えば、以下の①または②などに記載の自体公知の方法あるいはそれに準じる方法に従って用いることができる。

①入江寛編「ラジオイムノアッセイ」（講談社、昭和49年発行）

## ②入江寛編「続ラジオイムノアッセイ」(講談社、昭和54年発行)

(3) S E N R と、本発明のポリペプチドまたはその前駆体タンパク質またはそれらのアミド、エステルもしくはそれら塩(以下、リガンドまたはポリペプチドと略称する場合がある。)との結合性を变化させる化合物のスクリーニング方法

S E N R またはその塩や該部分ペプチドもしくはその塩を用いるか、または組換え型 S E N R の発現系を構築し、核発現系を用いたレセプター結合アッセイ系を用いることによって、ポリペプチドまたはその前駆体タンパク質と S E N R との結合性を变化させる化合物(例えば、ペプチド、蛋白質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物など)またはその塩をスクリーニングすることができる。このような化合物には、S E N R を介して細胞刺激活性(例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内  $Ca^{2+}$  遊離、細胞内 c A M P 生成、細胞内 c G M P 生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c - f o s の活性化、p H の低下などを促進する活性または抑制する活性など)を有する化合物(即ち S E N R アゴニスト)と該細胞刺激活性を有しない化合物(即ち S E N R アンタゴニスト)などが含まれる。「リガンドとの結合性を变化させる」とは、リガンドとの結合を阻害する場合とリガンドとの結合を促進する場合の両方を包含するものである。

すなわち、本発明は、(i) S E N R もしくはその塩または該 S E N R の部分ペプチドもしくはその塩に、本発明のポリペプチドまたはその前駆体タンパク質を接触させた場合と(ii)上記した S E N R もしくはその塩または該 S E N R の部分ペプチドもしくはその塩に、本発明のポリペプチドまたはその前駆体タンパク質および試験化合物を接触させた場合との比較を行なうことを特徴とする本発明のポリペプチドまたはその前駆体タンパク質と上記した S E N R との結合性を变化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法などを提供する。

本発明のスクリーニング方法においては、(i)上記した S E N R または該 S E N R の部分ペプチドに、本発明のポリペプチドまたはその前駆体タンパク質を接触させた場合と(ii)上記した S E N R または該 S E N R の部分ペプチ

ドに、本発明のポリペプチドまたはその前駆体タンパク質および試験化合物を接触させた場合における、例えば該 S E N R または該 S E N R の部分ペプチドに対するリガンドの結合力、細胞刺激活性などを測定して、比較する。

本発明のスクリーニング方法は具体的に、

① 標識した本発明のポリペプチドまたはその前駆体タンパク質を、上記した S E N R もしくはその塩または S E N R の部分ペプチドまたはその塩に接触した場合と、標識した本発明のポリペプチドまたはその前駆体タンパク質および試験化合物を S E N R もしくはその塩または S E N R の部分ペプチドもしくはその塩に接触させた場合における、標識した本発明のポリペプチドまたはその前駆体タンパク質の該 S E N R もしくはその塩、または該部分ペプチドもしくはその塩に対する結合力を測定し、比較することを特徴とする本発明のポリペプチドまたはその前駆体タンパク質と S E N R との結合性を变化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

② 標識した本発明のポリペプチドまたはその前駆体タンパク質を、S E N R を含有する細胞または該細胞の膜画分に接触させた場合と、標識した本発明のポリペプチドまたはその前駆体タンパク質および試験化合物を S E N R を含有する細胞または該細胞の膜画分に接触させた場合における、標識した本発明のポリペプチドまたはその前駆体タンパク質の該細胞または該膜画分に対する結合力を測定し、比較することを特徴とする本発明のポリペプチドまたはその前駆体タンパク質と S E N R との結合性を变化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

③ 標識した本発明のポリペプチドまたはその前駆体タンパク質を、S E N R をコードする DNA を含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現した S E N R に接触させた場合と、標識した本発明のポリペプチドまたはその前駆体タンパク質および試験化合物を S E N R をコードする DNA を含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現した S E N R に接触させた場合における、標識した本発明のポリペプチドまたはその前駆体タンパク質の S E N R に対する結合力を測定し、比較することを特徴とする本発明のポリペプチドまたはその前駆体タンパク質と S E N R との結合性を变化させる化合物

物またはその塩のスクリーニング方法、

④SENRを活性化させる化合物（例えば、本発明のポリペプチドまたはその前駆体タンパク質）をSENRを含有する細胞に接触させた場合と、SENRを活性化させる化合物および試験化合物をSENRを含有する細胞に接触させた場合における、SENRを介した細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 $Ca^{2+}$ 遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性などを測定し、比較することを特徴とする本発明のポリペプチドまたはその前駆体タンパク質とSENRとの結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、および

⑤SENRを活性化させる化合物（例えば、本発明のポリペプチドまたはその前駆体タンパク質など）をSENRをコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現したSENRに接触させた場合と、SENRを活性化させる化合物および試験化合物を、SENRをコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現したSENRに接触させた場合における、SENRを介する細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 $Ca^{2+}$ 遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性など）を測定し、比較することを特徴とする本発明のポリペプチドまたはその前駆体タンパク質とSENRとの結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法などである。

本発明のスクリーニング方法の具体的な説明を以下にする。

まず、本発明のスクリーニング方法に用いるSENRとしては、上記のSENRまたはSENRの部分ペプチドを含有するものであれば何れのものであってもよいが、ヒトや温血動物の臓器の膜画分などが好適である。しかし、特にヒト由来の臓器は入手が極めて困難なことから、スクリーニングに用いられるものとしては、組織交換体を用いて大量発現させたSENRなどが適している。

SENRを製造するには、前述の方法などが用いられる。

本発明のスクリーニング方法において、SENRを含有する細胞あるいは該細胞膜画分などを用いる場合、後述の調製法に従えばよい。

SENRを含有する細胞を用いる場合、該細胞をグルタルアルデヒド、ホルマリンなどで固定化してもよい。固定化方法はそれ自体公知の方法に従って行うことができる。

SENRを含有する細胞としては、SENRを発現した宿主細胞をい

該宿主細胞としては、前述の大腸菌、枯草菌、酵母、昆虫細胞、動物細胞などが挙げられる。

膜画分としては、細胞を破砕した後、それ自体公知の方法で得られる細胞膜が多く含まれる画分のことをいう。細胞の破砕方法としては、Potter-Elvehjem型ホモジナイザーで細胞を押し潰す方法、ワーリングブレンダーやポリトロン（Kinematic社製）による破砕、超音波による破砕、フレンチプレスなどで加圧しながら細胞を細いノズルから噴出させることによる破砕などが挙げられる。細胞膜の画分には、分画遠心分離法や密度勾配遠心分離法などの遠心力による分画法が主として用いられる。例えば、細胞破砕液を低速（500rpm～3000rpm）で短時間（通常、約1分～10分）遠心し、上清をさらに高速（15000rpm～30000rpm）で通常30分～2時間遠心し、得られる沈澱を膜画分とする。該膜画分中には、発現したSENRと細胞由来のリン脂質や膜蛋白質などの膜成分が多く含まれる。

該SENRを含有する細胞や膜画分中のSENRの量は、1細胞当たり～ $10^6$ 分子であるのが好ましく、 $10^6 \sim 10^7$ 分子であるのが好適である。なお、発現量が多いほど膜画分当たりのリガンド結合活性（比活性）が高くなり、高感度なスクリーニング系の構築が可能になるばかりでなく、同一ロットで大量の試料を測定できるようになる。

本発明のポリペプチドまたはその前駆体タンパク質とSENRとの結合性を変化させる化合物をスクリーニングする前記の①～③を実施するためには、適当なSENR画分と、標識した本発明のポリペプチドまたはその前駆体タンパク質が用いられる。SENR画分としては、天然型のSENR画分が、または

それと同等の活性を有する組換え型SENR画分などが望ましい。ここで、同等の活性とは、同等のリガンド結合活性などを示す。標識したリガンドとしては、標識したリガンド、標識したリガンドアナログ化合物などが用いられる。例えば $[^3\text{H}]$ 、 $[^{125}\text{I}]$ 、 $[^{14}\text{C}]$ 、 $[^{35}\text{S}]$ などで標識されたリガンドなどを利用することができる。

具体的には、本発明のポリペプチドまたはその前駆体タンパク質とSENRとの結合性を変化させる化合物のスクリーニングを行うには、まずSENRを含有する細胞または細胞の膜画分を、スクリーニングに適したバッファーに懸濁することによりレセプター標品を調製する。バッファーには、 $\text{pH}4\sim10$ （望ましくは $\text{pH}6\sim8$ ）のリン酸バッファー、トリス-塩酸バッファーなどのリガンドとレセプターとの結合を阻害しないバッファーであればいずれでもよい。また、非特異的結合を低減させる目的で、 $\text{CHAPS}$ 、 $\text{Tween-80}^{\text{TM}}$ （花王-アトラス社）、ジギトニン、デオキシコレートなどの界面活性剤をバッファーに加えることもできる。さらに、プロテアーゼによるレセプターや本発明のポリペプチドの分解を抑える目的で $\text{PMSEF}$ 、ロイペプチン、 $\text{E-64}$ （ペプチド研究所製）、ペプスタチンなどのプロテアーゼ阻害剤を添加することもできる。0.01ml $\sim$ 10mlの該レセプター溶液に、一定量（5000cpm $\sim$ 500000cpm）の標識した本発明のポリペプチドを添加し、同時に $10^{-10}\sim10^{-7}\text{M}$ の試験化合物を共存させる。非特異的結合量（NSB）を知るために大過剰の未標識の本発明のポリペプチドを加えた反応チューブも用意する。反応は0℃から50℃、望ましくは4℃から37℃で20分から24時間、望ましくは30分から3時間行う。反応後、ガラス繊維濾紙等で濾過し、適量の同バッファーで洗浄した後、ガラス繊維濾紙に残存する放射活性を液体シンチレーションカウンタまたはヤーカウンタで計測する。拮抗する物質がない場合のカウント（B<sub>0</sub>）から非特異的結合量（NSB）を引いたカウント（B<sub>0</sub>-NSB）を100%とした時、特異的結合量（B-NSB）が例えば50%以下になる試験化合物を拮抗阻害能力のある候補物質として選択することができる。

本発明のポリペプチドまたはその前駆体タンパク質とSENRとの結合性を

変化させる化合物をスクリーニングする前記の④～⑤の方法を実施するために、SENRを介する細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチコリン遊離、細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性など）を公知の方法または市販の測定用キットを用いて測定することができる。具体的には、まず、SENRを含有する細胞をマルチウェルプレート等に培養する。スクリーニングを行うにあたっては前もって新鮮な培地あるいは細胞に毒性を示さない適当なバッファーに交換し、試験化合物などを添加して一定時間インキュベートした後、細胞を抽出あるいは上清液を回収して、生成した産物をそれぞれの方法に従って定量する。細胞刺激活性の指標とする物質（例えば、アラキドン酸など）の生成が、細胞が含有する分解酵素によって検定困難な場合は、該分解酵素に対する阻害剤を添加してアッセイを行なってもよい。また、cAMP産生抑制などの活性については、フォルスコリンなどで細胞の基礎的産生量を増大させておいた細胞に対する産生抑制作用として検出することができる。

細胞刺激活性を測定してスクリーニングを行なうには、適当なSENRを発現した細胞が必要である。本発明のSENRを発現した細胞としては、前述の組換え型SENR発現細胞株などが望ましい。

試験化合物としては、例えばペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、成化化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液などが挙げられる。

本発明のポリペプチドまたはその前駆体タンパク質とSENRとの結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング用キットは、SENRまたはその塩、SENRの部分ペプチドまたはその塩、SENRを含有する細胞、あるいはSENRを含有する細胞の膜画分、および本発明のポリペプチドまたはその前駆体タンパク質を含有するものである。

本発明のスクリーニング用キットの例としては、次のものが挙げられる。

#### 1. スクリーニング用試薬

## ①測定用緩衝液および洗浄用緩衝液

Hanks' Balanced Salt Solution (ギブコ社製) に、0.05%のウシ血清アルブミン (シグマ社製) を加えたもの。

孔径0.45μmのフィルターで濾過滅菌し、4℃で保存するか、あるいは用時調製しても良い。

## ②SENR標準品

SENRを発現させたCHO細胞を、12穴プレートに $5 \times 10^5$ 個/穴で継代し、37℃、5%CO<sub>2</sub>、95%airで2日間培養したもの。

## ③標識リガンド

[<sup>3</sup>H]、[<sup>125</sup>I]、[<sup>14</sup>C]、[<sup>35</sup>S] などで標識したリガンド

適当な溶媒または緩衝液に溶解したものを4℃あるいは-20℃にて保存し、用時に測定用緩衝液にて1μMに希釈する。

## ④リガンド標準液

本発明のポリペプチドまたはその前駆体タンパク質を0.1%ウシ血清アルブミン (シグマ社製) を含むPBSで1mMとなるように溶解し、-20℃で保存する。

## 2. 測定法

①12穴組織培養用プレートにて培養したSENRを発現させた細胞を、測定用緩衝液1mlで2回洗浄した後、490μlの測定用緩衝液を各穴に加える。

20

② $10^{-3}$ ~ $10^{-10}$ Mの試験化合物溶液を5μl加えた後、標識した本発明のペプチドまたはその前駆体タンパク質を5μl加え、室温にて1時間反応させる。非特異的結合量を知るためには試験化合物のかわりに $10^{-3}$ Mのリガンドを5μl加えておく。

③反応液を除去し、1mlの洗浄用緩衝液で3回洗浄する。細胞に結合した標識リガンドを0.2N NaOH-1%SDSで溶解し、4mlの液体シンチレーターA (和光純薬製) と混合する。

25

④液体シンチレーションカウンター (ベックマン社製) を用いて放射活性を測定し、Percent Maximum Binding (PMB) を次の式 (数1) で求める。

## 〔数1〕

$$PMB = [(B - NSB) / (B_0 - NSB)] \times 100$$

PMB : Percent Maximum Binding

B : 検体を加えた時の値

5 NSB : Non-specific Binding (非特異的結合量)

B<sub>0</sub> : 最大結合量

本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得る化合物またはその塩は、本発明のポリペプチドまたはその前駆体タンパク質とSENRとの結合を変化させる (結合を阻害あるいは促進する) 化合物であり、具体的にはSENRを介して細胞刺激活性を有する化合物またはその塩 (いわゆるSENRアゴニスト)、あるいは該刺激活性を有しない化合物 (いわゆるSENRアンタゴニスト) である。該化合物としては、ペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物などが挙げられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

15 上記SENRアゴニストであるかアンタゴニストであるかの具体的な評価方法は以下の (i) または (ii) に従えばよい。

(i) 前記①~③のスクリーニング方法で示されるバインディング・アッセイを行い、本発明のポリペプチドまたはその前駆体タンパク質とSENRとの結合性を変化させる (特に、結合を阻害する) 化合物を得た後、該化合物が上記したSENRを介する細胞刺激活性を有しているかを否かを測定する。細胞刺激活性を有する化合物またはその塩はSENRアゴニストであり、該活性を有しない化合物またはその塩はSENRアンタゴニストである。

20

(ii) (a) 試験化合物をSENRを含有する細胞に接触させ、上記SENRを介した細胞刺激活性を測定する。細胞刺激活性を有する化合物またはその塩はSENRアゴニストである。

25

(b) SENRを活性化する化合物 (例えば、本発明のポリペプチド、その前駆体タンパク質またはSENRアゴニストなど) をSENRを含有する細胞に接触させた場合と、SENRを活性化する化合物および試験化合物をSENRを含有する細胞に接触させた場合における、SENRを介した細胞刺激活性を測定



し、比較する。SENRを活性化する化合物による細胞刺激活性を減少させる化合物またはその塩はSENRアングゴニストである。

該SENRアングゴニストは、SENRに対する本発明のポリペプチドまたはその前駆体タンパク質が有する生理活性と同様の作用を有しているため、本発明のポリペプチドまたはその前駆体タンパク質と同様に安全で低毒性な医薬として有用である。

逆に、SENRアングゴニストは、SENRに対する本発明のポリペプチドが有する生理活性を抑制することができるので、該レセプター活性を抑制する安全で低毒性な医薬として有用である。

本発明のポリペプチドまたはその前駆体タンパク質は中枢神経機能調節作用、循環機能調節作用、心臓機能調節作用、腎臓機能調節作用、泌尿器機能調節作用あるいは感覚器官調節作用などに関与していることから、SENRアングゴニストは、たとえば老人性痴呆、脳血管性痴呆、系統変成型の退行変成疾患（例：アルツハイマー病、パーキンソン病、ピック病、ハンチントン病など）に起因する痴呆、高（低）血圧症、腎疾患（例：慢性腎不全、腎炎など）、心疾患（例：心不全、急性心筋梗塞など）、頻尿、尿失禁、難聴、嗅覚異常、視覚異常などの疾病の治療・予防剤として用いることができる。

上記のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物の塩としては、例えば、薬学的に許容可能な塩などが用いられる。例えば、無機塩基との塩、有機塩基との塩、無機酸との塩、有機酸との塩、塩基性または酸性アミノ酸との塩などがあげられる。

無機塩基との塩の好適な例としては、例えばナトリウム塩、カリウム塩などのアルカリ金属塩、カルシウム塩、マグネシウム塩などのアルカリ土類金属塩、ならびにアルミニウム塩、アンモニウム塩などがあげられる。

有機塩基との塩の好適な例としては、例えばトリメチルアミン、トリエチルアミン、ピリジン、ピコリン、2, 6-ピリジン、エタノールアミン、ジエタノールアミン、トリエタノールアミン、シクロヘキシルアミン、ジシクロヘキシルアミン、N, N'-ジベンジルエチレンジアミンなどの塩があげられる。

無機酸との塩の好適な例としては、例えば塩酸、臭化水素酸、硫酸、リン酸

などの塩があげられる。

有機酸との塩の好適な例としては、例えばギ酸、酢酸、プロピオン酸、フマル酸、シュウ酸、酒石酸、マレイン酸、クエン酸、コハク酸、リンゴ酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸、安息香酸などの塩があげられる。

塩基性アミノ酸との塩の好適な例としては、例えばアルギニン、リジン、オルチニンなどの塩があげられ、酸性アミノ酸との好適な例としては、例えばアスパラギン酸、グルタミン酸などの塩があげられる。

本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩を上述の医薬として使用する場合、上記の本発明のポリペプチドまたはその前駆体タンパク質を医薬として実施する場合と同様にして実施することができる。

(4) 本発明のポリペプチドまたはその前駆体タンパク質に対する抗体または抗血清の製造

本発明のポリペプチドまたはその前駆体タンパク質に対する抗体（例えば、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体）または抗血清は、本発明のポリペプチドまたはその前駆体タンパク質またはそれらの部分ペプチドを抗原として用い、自体公知の抗体または抗血清の製造法に従って製造することができる。

例えば、ポリクローナル抗体は、後述の方法に従って製造することができる。

#### [ポリクローナル抗体の作製]

本発明のポリペプチドまたはその前駆体タンパク質に対するポリクローナル抗体は、それ自体公知あるいはそれに準じる方法にしたがって製造することができる。例えば、免疫抗原（ポリペプチド等抗原）とキャリアー蛋白質との複合体をつくり、後述のモノクローナル抗体の製造法と同様に温血動物（例えば、哺乳動物（例、ウサギ、ヒツジ、ヤギ、ラット、マウス、モルモット、ウシ、ウマ、ブタ）、鳥類（例、ニワトリ、ハト、アヒル、ガチョウ、ウズラ）など）に免疫を行ない、該免疫動物から本発明のポリペプチドに対する抗体含有物を採取して、抗体の分離精製を行なうことにより製造できる。

哺乳動物を免疫するために用いられる免疫抗原とキャリアー蛋白質との複合



体に関し、キャリアー蛋白質の種類およびキャリアーとハプテン（本発明のポリペプチドまたはその部分ペプチド）との混合比は、キャリアーに架橋させて免疫したハプテンに対して抗体が効率良くできれば、どの様なものをどの様な比率で架橋させてもよいが、例えば、ウシ血清アルブミン、ウシサイログロブリン、キーホール・リンベット・ヘモシアニン等を重量比でハプテン1に対し、約0.1～2.0、好ましくは約1～5の割合でカプセルさせる方法が用いられる。

また、ハプテンとキャリアーのカプリングには、種々の縮合剤を用いることができるが、グルタルアルデヒドやカルボジミド、マレイミド活性エステル、チオール基、ジチオピリジル基を含有する活性エステル試薬等が用いられる。

縮合生成物は、上記温血動物に対して、抗体産生が可能な部位にそれ自体あるいは担体、希釈剤とともに投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。投与は、通常約2～6週毎に1回ずつ、計約3～10回程度行なわれる。

ポリクローナル抗体は、上記の方法で免疫された哺乳動物の血液、尿など、好ましくは血液から採取される。

抗血清中の本発明のポリペプチドまたはその前駆体タンパク質に対する抗体価の測定は、後述のハイブリドーマ培養上清の抗体価の測定と同様にして測定できる。抗体の分離精製は、後述のモノクローナル抗体の分離精製と同様の免疫グロブリンの分離精製法に従って行なうことができる。

また、モノクローナル抗体は、後述の方法に従って製造することができる。

〔モノクローナル抗体の作製〕

(a) モノクローナル抗体産生細胞の作製

本発明のポリペプチドまたはその前駆体タンパク質は、温血動物（例えば、哺乳温血動物（例、ウサギ、ヒツジ、ヤギ、ラット、マウス、モルモット、ウシ、ウマ、ブタ）、鳥類（例、ニワトリ、ハト、アヒル、ガチョウ、ウズラ）など）に対して投与により抗体産生が可能な部位にそれ自体あるいは担体、希

釈剤とともに投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。投与は通常2～6週毎に1回ずつ、計2～10回程度行われる。

モノクローナル抗体産生細胞の作製に際しては、抗原を免疫された上記の温血動物、たとえばマウスなどから抗体価の認められた個体を選択し最終免疫の2～5日後に脾臓またはリンパ節を採取し、それらに含まれる抗体産生細胞を骨髓腫細胞と融合させることにより、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを調製することができる。抗血清中の抗体価の測定は、例えば後記の陽性対照として本発明のポリペプチド、その前駆体タンパク質またはそれらの部分ペプチドと抗血清とを反応させたのち、抗体に結合した標識剤の活性を測定することによりなされる。融合操作は既知の方法、たとえばケーラーとミルスタインの方法（ネイチャー（Nature）、256、495（1975））等に従い実施できる。融合促進剤としてはポリエチレングリコール（PEG）やセンドウィルスなどが挙げられるが、好ましくはPEGが用いられる。

骨髓腫細胞としてはたとえばNS-1、P3U1、SP2/0、AP-1などがあげられるが、P3U1が好ましく用いられる。用いられる抗体産生細胞（脾臓細胞）数と骨髓腫細胞数との好ましい比率は1：1～20：1程度であり、PEG（好ましくはPEG1000～PEG6000）が10～80％程度の濃度で添加され、20～40℃、好ましくは30～37℃で1～10分間インキュベートすることにより効率よく細胞融合を実施できる。

本発明のポリペプチドまたはその前駆体タンパク質に対する抗体産生ハイブリドーマのスクリーニングには種々の方法が使用できるが、たとえば本発明のポリペプチド抗原またはその前駆体タンパク質抗原を直接あるいは担体とともに吸着させた固相（例、マイクロプレート）にハイブリドーマ培養上清を添加し、次に放射性物質や酵素などで標識した抗免疫グロブリン抗体（細胞融合に用いられる細胞がマウスの場合、抗マウス免疫グロブリン抗体が用いられる）またはプロテインAを加え、固相に結合した本発明のポリペプチドまたはその前駆体タンパク質に対するモノクローナル抗体を検出する方法、抗免疫グロブリン抗体またはプロテインAを吸着させた固相にハイブリドーマ培養上清を添

加し、放射性物質や酵素などで標識した本発明のポリペプチドを加え、固相に結合した本発明のポリペプチドまたはその前駆体タンパク質に対するモノクロ一ナル抗体を検出する方法などがあげられる。

本発明のポリペプチドまたはその前駆体タンパク質に対するモノクロ一ナル抗体の選別は、自体公知あるいはそれに準じる方法に従って行なうことができる。通常 HAT (ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン) を添加した動物細胞用培地で行なわれる。選別および育種用培地としては、ハイブリドーマが生育できるものならばどのような培地を用いても良い。例えば、1~20%、好ましくは10~20%の牛胎児血清を含む RPMI 1640 培地、1~10%の牛胎児血清を含む GIT 培地 (和光純薬工業 (株)) あるいはハイブリドーマ培養用無血清培地 (SFM-101、白水製薬 (株)) などを用いることができる。培養温度は、通常 20~40℃、好ましくは約 37℃である。培養時間は、通常 5日~3週間、好ましくは1週間~2週間である。培養は、通常 5%炭酸ガス下で行なわれる。ハイブリドーマ培養上清の抗体価は、上記の抗血清中の本発明のポリペプチドに対する抗体価の測定と同様にして測定できる。

#### (b) モノクロナル抗体の精製

本発明のポリペプチドまたはその前駆体タンパク質に対するモノクロナル抗体の分離精製は通常のポリクロナル抗体の分離精製と同様に免疫グロブリンの分離精製法 (例、塩析法、アルコール沈殿法、等電点沈殿法、電気泳動法、イオン交換法 (例、DEAE) による吸脱着法、超遠心法、ゲルろ過法、抗原結合固相あるいはプロテインAあるいはプロテインGなどの活性吸着剤により抗体のみを採取し、結合を解離させて抗体を得る特異的精製法) に従って行われる。

上記の (a) および (b) の方法に従って製造させる本発明のポリペプチドまたはその前駆体タンパク質に対する抗体は、それぞれ本発明のポリペプチドまたはその前駆体タンパク質を特異的に認識することができるので、被検液中の本発明のポリペプチドまたはその前駆体タンパク質の定量、特にサンドイッチ免疫測定法による定量などに使用することができる。

すなわち、本発明は、例えば、

(1) 本発明のポリペプチドまたはその前駆体タンパク質に反応する抗体と、被検液および標識した本発明のポリペプチドまたはその前駆体タンパク質とを総合的に反応させ、該抗体に結合した標識した本発明のポリペプチドまたはその前駆体タンパク質の割合を測定することを特徴とする被検液中の本発明のポリペプチドまたはその前駆体タンパク質の定量法、

(ii) 被検液と担体上に不溶化した抗体および標識化された抗体とを同時あるいは連続的に反応させたのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することとを特徴とする被検液中の本発明のポリペプチドまたはその前駆体タンパク質の定量法において、一方の抗体が、本発明のポリペプチドまたはその前駆体タンパク質の N 末端部を認識する抗体で、他方の抗体が本発明のポリペプチドまたはその前駆体タンパク質の C 末端部に反応する抗体であることを特徴とする被検液中の本発明のポリペプチドまたはその前駆体タンパク質の定量法を提供する。

本発明のポリペプチドまたはその前駆体タンパク質を認識するモノクロナル抗体を用いて本発明のポリペプチドまたはその前駆体タンパク質の測定を行なえるほか、組織染色等による検出を行なうこともできる。これらの目的には、抗体分子そのものを用いてもよく、また、抗体分子の  $F(a b')_2$ 、 $F a b'$ 、あるいは  $F a b$  画分を用いてもよい。本発明の抗体を用いる測定法は、特に制限されるべきものではなく、被測定液中の抗原量 (例えばポリペプチドまたはその前駆体タンパク質) は抗体-抗原複合体の量を化学的または物理的手段により検出し、これを既知量の抗原を含む標準液を用いて作製した標準曲線より算出する測定法であれば、いずれの測定法を用いてもよい。例えば、ネフロメトリ-、競合法、イムノメトリック法およびサンドイッチ法が好適に用いられるが、感度、特異性の点で、後述するサンドイッチ法を用いるのが特に好ましい。

標識物質を用いる測定法に用いられる標識剤としては、放射性同位元素、酵素、蛍光物質、発光物質などが挙げられる。放射性同位元素としては、例えば  $[^{125}I]$ 、 $[^{131}I]$ 、 $[^3H]$ 、 $[^{14}C]$  などが、上記酵素としては、安定で比活性の大きなものが好ましく、例えば  $\beta$ -ガラクトシダーゼ、 $\beta$ -グルコ

シダーゼ、アルカリフォスファターゼ、パーオキシダーゼ、リンゴ酸脱水素酵素等が、蛍光物質としては、フルオレスカミン、フルオレセシンイソチオシアネートなどが、発光物質としては、ルミノール、ルミノール誘導体、ルシフェリン、ルシゲニンなどがそれぞれ挙げられる。さらに、抗体あるいは抗原と標識剤との結合にビオチン-アビジン系を用いることもできる。

抗原あるいは抗体の不溶性に当っては、物理吸着を用いてもよく、また通常蛋白質あるいは酵素等を不溶化、固定化するのに用いられる化学結合を用いる方法でもよい。担体としては、アガロース、デキストラン、セルロースなどの不溶性多糖類、ポリスチレン、ポリアクリルアミド、シリコン等の合成樹脂、あるいはガラス等が挙げられる。

サンドイッチ法においては不溶化した抗ポリペプチド抗体に被検液を反応させ（１次反応）、さらに標識化抗ポリペプチド抗体を反応させ（２次反応）たのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することにより被検液中のポリペプチド量を定量することができる。１次反応と２次反応は逆の順序に行っても、また、同時に行なってもよいし時間をずらして行なってもよい。

標識化剤および不溶化の方法は前記のそれらに準じることができる。また、サンドイッチ法による免疫測定法において、固相用抗体あるいは標識用抗体に用いられる抗体は必ずしも１種類である必要はなく、測定感度を向上させる等の目的で２種類以上の抗体の混合物を用いてもよい。

本発明のサンドイッチ法による本発明のポリペプチドまたはその前駆体タンパク質の測定法においては、１次反応と２次反応に用いられる抗ポリペプチドまたはその前駆体タンパク質抗体は本発明のポリペプチドまたはその前駆体タンパク質の結合する部位が相異なる抗体が好ましく用いられる。即ち、１次反応および２次反応に用いられる抗体は、例えば、２次反応で用いられる抗体が、本発明のポリペプチドまたはその前駆体タンパク質のＣ末端部を認識する場合、１次反応で用いられる抗体は、好ましくはＣ末端部以外、例えばＮ末端部を認識する抗体が用いられる。

本発明のポリペプチドまたはその前駆体タンパク質に対する抗体をサンドイッチ法以外の測定システム、例えば、競合法、イムノメトリック法あるいはネ

フロメトリなどを用いることができる。競合法では、被検液中の抗原と標識抗原とを抗体に対して競合的に反応させたのち、未反応の標識抗原と（Ｆ）と抗体と結合した標識抗原（Ｂ）とを分離し（Ｂ／Ｆ分離）、Ｂ、Ｆいずれかの標識量を測定し、被検液中の抗原量を定量する。本反応法には、抗体として可溶性抗体を用い、Ｂ／Ｆ分離をポリエチレングリコール、前記抗体に対する第２抗体などを用いる液相法、および、第１抗体として固相化抗体を用いるか、あるいは、第１抗体は可溶性のものを用い第２抗体として固相化抗体を用いる相合法とが用いられる。

イムノメトリック法では、被検液中の抗原と固相化抗原とを一定量の標識化抗体に対して競合反応させた後固相と液相を分離するか、あるいは、被検液中の抗原と過剰量の標識化抗体とを反応させ、次に固相化抗原を加え未反応の標識化抗体を固相に結合させたのち、固相と液相を分離する。次に、いずれかの相の標識量を測定し被検液中の抗原量を定量する。

また、ネフロメトリーでは、ゲル内あるいは溶液中で抗原抗体反応の結果生じた不溶性の沈降物の量を測定する。被検液中の抗原量が僅かであり、少量の沈降物しか得られない場合にもレーザーの散乱を利用するレーザーネフロメトリーなどが好適に用いられる。

これらの免疫学的測定法を本発明の測定方法に適用するにあたっては、特別の条件、操作等の設定は必要とされない。それぞれの方法における通常の条件、操作法に当業者の通常の技術的配慮を加えて本発明のポリペプチド、その前駆体タンパク質またはそれらの部分ペプチドの測定系を構築すればよい。

これらの一般的な技術手段の詳細については、総説、成書などを参照することができる（例えば、入江 寛編「ラジオイムノアッセイ」（講談社、昭和４９年発行）、入江 寛編「続ラジオイムノアッセイ」（講談社、昭和５４年発行）、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」（医学書院、昭和５３年発行）、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」（第２版）（医学書院、昭和５７年発行）、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」（第３版）（医学書院、昭和６２年発行）、「Methods in ENZYMOLOGY」Vol. 70 (Immunological Techniques (Part A))、同書 Vol. 73 (Immunological Techniques (Part B))、同書 Vol. 74 (Immunological

Techniques (Part C)), 同 書 Vol. 84 (Immunochemical Techniques (Part D: Selected Immunoassays)), 同 書 Vol. 92 (Immunochemical Techniques (Part E: Monoclonal Antibodies and General Immunoassay Methods)), 同 書 Vol. 121 (Immunochemical Techniques (Part I: Hybridoma Technology and Monoclonal Antibodies)) (以上、アカデミックプレス社発行) など参照)。

以上のように、本発明のポリペプチドまたはその前駆体タンパク質に対する抗体を用いることによって、本発明のポリペプチドまたはその前駆体タンパク質を感度良く定量することができる。

被検液中の本発明のポリペプチドまたはその前駆体タンパク質を定量することによって、本発明のポリペプチドまたはその前駆体タンパク質が関与する疾患を診断することができる。本発明のポリペプチドまたはその前駆体タンパク質が関与する疾患としては、例えば、老人性痴呆、脳血管性痴呆、系統変成型の退行変成疾患 (例：アルツハイマー病、パーキンソン病、ピック病、ハンチントン病など) に起因する痴呆、高 (低) 血圧症、腎疾患 (例：慢性腎不全、腎炎など)、心疾患 (例：心不全、急性心筋梗塞など)、頻尿、尿失禁、難聴、嗅覚異常、視覚異常などの疾病があげられる。被検液は被検哺乳動物 (例、ヒト、ウサギ、ヒツジ、ヤギ、ラット、マウス、モルモット、ウシ、ウマ、ブタ) から自体外公知の方法によって調製できる。被検液としては、例えば、血液、リンパ液、尿などが挙げられる。

本明細書および図面において、塩基やアミノ酸などを略号で表示する場合、IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature による略号あるいは当該分野における慣用略号に基づくものであり、その例を下記する。またアミノ酸に関し光学異性体があり得る場合は、特に明示しなければし体を示すものとする。

DNA : デオキシリボ核酸  
cDNA : 相補的デオキシリボ核酸  
A : アデニン  
T : チミン  
G : グアニン

C : シトシン  
Y : チミンまたはシトシン  
N : チミン、シトシン、アデニンまたはグアニン  
R : アデニンまたはグアニン  
M : シトシンまたはアデニン  
W : チミンまたはアデニン  
S : シトシンまたはグアニン  
RNA : リボ核酸  
mRNA : メッセンジャーリボ核酸  
dATP : デオキシアデノシン三リン酸  
dTTP : デオキシチミジン三リン酸  
dGTP : デオキシグアノシン三リン酸  
dCTP : デオキシシチジン三リン酸  
ATP : アデノシン三リン酸  
EDTA : エチレンジアミン四酢酸  
SDS : ドデシル硫酸ナトリウム  
TFA : トリフルオロ酢酸  
EIA : エンザイムイムノアッセイ  
Gly または G : グリシン  
Ala または A : アラニン  
Val または V : バリン  
Leu または L : ロイシン  
Ile または I : イソロイシン  
Ser または S : セリン  
Thr または T : スレオニン  
Cys または C : システイン  
Met または M : メチオニン  
Glu または E : グルタミン酸  
Asp または D : アスパラギン酸

L y s または K : リジン  
 A r g または R : アルギニン  
 H i s または H : ヒスチジン  
 P h e または F : フェニルアラニン  
 T y r または Y : チロシン  
 T r p または W : トリプトファン  
 P r o または P : プロリン  
 A s n または N : アスパラギン  
 G l n または Q : グルタミン  
 p G l u : ピログルタミン酸  
 M e : メチル基  
 E t : エチル基  
 B u : ブチル基  
 P h : フェニル基  
 T C : チアゾリジン-4 (R) -カルボキサミド基  
 B o m : ベンジルオキシメチル  
 N M P : N-メチルピロリドン  
 P A M : フェニルアセトアミドメチル

また、本明細書中で常用される置換基、保護基および試薬を下記の記号で表  
 記する。

T o s : p-tert-ブチルフェニル  
 H O N B : N-ヒドロキシ-5-ノルボルネン-2, 3-ジカルボキシイ  
 ド  
 B z l : ベンジル  
 Z : ベンジルオキシカルボニル  
 B r - Z : 2-ブロモベンジルオキシカルボニル  
 C l - Z : 2-クロロベンジルオキシカルボニル  
 B o c : t-ブチルオキシカルボニル  
 H O B t : 1-ヒドロキシベンズトリアゾール

D C C : N, N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド  
 T F A : トリフルオロ酢酸  
 F m o c : N-9-フルオレニルメトキシカルボニル  
 D N P : ジニトロフェニル  
 B u m : ターシャリープトキシメチル  
 T r t : トリチル  
 M e B z l : 4-メチルベンジル  
 C H O : ホルミル  
 N M P : N-メチルピロリドン

本願明細書の配列表の配列番号は、以下の配列を示す。

〔配列番号：1〕

ラット urotensin II like peptide 前駆体蛋白質をコードする cDNA の部分配列  
 を取得するのに使用した合成 DNA を示す。

〔配列番号：2〕

ラット urotensin II like peptide 前駆体蛋白質をコードする cDNA の部分配列  
 を取得するのに使用した合成 DNA を示す。

〔配列番号：3〕

ラット urotensin II like peptide 前駆体蛋白質の一部をコードする cDNA の塩  
 基配列を示す。

〔配列番号：4〕

ラット urotensin II like peptide 前駆体蛋白質をコードする cDNA の 5'側  
 配列を取得するための RACE-PCR に使用した合成 DNA を示す。

〔配列番号：5〕

ラット urotensin II like peptide 前駆体蛋白質をコードする cDNA の 5'側部分  
 配列を取得するための RACE-PCR に使用した合成 DNA を示す。

〔配列番号：6〕

ラット urotensin II like peptide 前駆体蛋白質をコードする cDNA の 5'側部分  
 配列の塩基配列を示す。

〔配列番号：7〕

ラット urotensin II like peptide 前駆体蛋白質をコードする cDNA の 3'側部分配列を取得するための RACE-PCR に使用した合成 DNA を示す。

(配列番号 : 8)

ラット urotensin II like peptide 前駆体蛋白質をコードする cDNA の 3'側部分配列を取得するために放射化標識プローブとして使用した合成 DNA を示す。

(配列番号 : 9)

ラット urotensin II like peptide 前駆体蛋白質をコードする cDNA の 3'側部分配列の塩基配列を示す。

(配列番号 : 10)

ラット urotensin II like peptide 前駆体蛋白質をコードする cDNA の全長配列を取得するのに使用した合成 DNA を示す。

(配列番号 : 11)

ラット urotensin II like peptide 前駆体蛋白質をコードする cDNA の全長配列を取得するのに使用した合成 DNA を示す。

(配列番号 : 12)

ラット urotensin II like peptide 前駆体蛋白質 cDNA の全塩基配列を示す。

(配列番号 : 13)

ラット urotensin II like peptide 前駆体蛋白質の全アミノ酸配列を示す。

(配列番号 : 14)

ラット urotensin II like peptide-1 のアミノ酸配列を示す。

(配列番号 : 15)

ラット urotensin II like peptide-2 のアミノ酸配列を示す。

(配列番号 : 16)

配列番号 14 (ラット urotensin II like peptide-1) の DNA 配列を示す。

(配列番号 : 17)

配列番号 15 (ラット urotensin II like peptide-2) の DNA 配列を示す。

(配列番号 : 18)

マウス urotensin II like peptide 前駆体蛋白質をコードする cDNA の 5'側部分配列を取得するのに使用した合成 DNA を示す。

(配列番号 : 19)

マウス urotensin II like peptide 前駆体蛋白質をコードする cDNA の 5'側部分配列を取得するのに使用した合成 DNA を示す。

(配列番号 : 20)

マウス urotensin II like peptide 前駆体蛋白質をコードする cDNA の 5'側部分配列を示す。

(配列番号 : 21)

マウス urotensin II like peptide 前駆体蛋白質をコードする cDNA の 3'側部分配列を取得するのに使用した合成 DNA を示す。

(配列番号 : 22)

マウス urotensin II like peptide 前駆体蛋白質をコードする cDNA の 3'側部分配列および全長配列を取得するのに使用した合成 DNA を示す。

(配列番号 : 23)

マウス urotensin II like peptide 前駆体蛋白質をコードする cDNA の 3'側部分配列を示す。

(配列番号 : 24)

マウス urotensin II like peptide 前駆体蛋白質をコードする cDNA の全長配列を取得するのに使用した合成 DNA を示す。

(配列番号 : 25)

マウス urotensin II like peptide 前駆体蛋白質 cDNA の全塩基配列を示す。

(配列番号 : 26)

マウス urotensin II like peptide 前駆体蛋白質の全アミノ酸配列を示す。

(配列番号 : 27)

マウス urotensin II like peptide のアミノ酸配列を示す。

(配列番号 : 28)

配列番号 27 (マウス urotensin II like peptide) の DNA 配列を示す。

(配列番号 : 29)

ラット SENR 蛋白質のアミノ酸配列を示す。

(配列番号 : 30)

ヒト SENR 蛋白質のアミノ酸配列を示す。

(配列番号：31)

前駆体蛋白質のアミノ酸配列から推定されるラット urotensin II like peptide の成熟ペプチドのアミノ酸配列を示す。

(配列番号：32)

前駆体蛋白質のアミノ酸配列から推定されるラット urotensin II like peptide の成熟ペプチドのアミノ酸配列を示す。

(配列番号：33)

前駆体蛋白質のアミノ酸配列から推定されるマウス urotensin II like peptide の成熟ペプチドのアミノ酸配列を示す。

(配列番号：34)

前駆体蛋白質のアミノ酸配列から推定されるマウス urotensin II like peptide の成熟ペプチドのアミノ酸配列を示す。

(配列番号：35)

配列番号：31 (ラット urotensin II like peptide の成熟ペプチド) の DNA 配列を示す。

(配列番号：36)

配列番号：32 (ラット urotensin II like peptide の成熟ペプチド) の DNA 配列を示す。

(配列番号：37)

配列番号：33 (マウス urotensin II like peptide の成熟ペプチド) の DNA 配列を示す。

(配列番号：38)

配列番号：34 (マウス urotensin II like peptide の成熟ペプチド) の DNA 配列を示す。

後述の実施例 3 で得られた形質転換体 *Escherichia coli* XL10-Gold/pCRL1-rU11 like は、平成 11 年 6 月 2 日から日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1 番 3 号 (郵便番号 305-8566) の通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所 (NIBH) に寄託番号 FERM BP-6740 として、日本国大阪市淀川

区十三本町 2 丁目 17 番 85 号 (郵便番号 532-8686) の財団法人発酵研究所 (IFO) に平成 11 年 4 月 18 日から寄託番号 IFO 16285 として寄託されている。

# 実施例

以下に参考例および実施例を示して、本発明をより詳細に説明するが、これらは本発明の範囲を限定するものではない。

参考例 1 ヒト脳由来 cDNA を用いた PCR 法によるヒト SENR (=GPR14) 受容体 cDNA の増幅

ヒト脳由来 poly (A)<sup>+</sup> RNA (クロンテック社) を鋳型とし、ランダムプライマーを用いて逆転写反応を行なう。逆転写反応は、タカラ RNA PCR ver. 2 キットの試薬を使用する。次にこの逆転写生成物を鋳型として用い、配列番号 23 および 24 の合成 DNA プライマーを用いて PCR 法による増幅を行なう。合成 DNA プライマーは受容体蛋白に翻訳される領域の遺伝子が増幅されるように構築するが、その際に遺伝子の 5'側に制限酵素 *Sal* I の認識する塩基配列が付加され、また 3'側に制限酵素 *Spe* I の認識する塩基配列が付加されるように、5'側および 3'側にそれぞれの制限酵素の認識配列を付加する。反応液の組成は、cDNA 鋳型 5  $\mu$  l、合成 DNA プライマー各 1  $\mu$  M、0.2 mM dNTPs、1 mM  $MgCl_2$ 、KOD DNA ポリメラーゼ 1  $\mu$  l および酵素に付属のバッファーで、総反応量は 50  $\mu$  l とする。増幅のためのサイクルはサーマルサイクラー (パーキンエルマー社) を用いて 94 度・60 秒の加熱の後、94℃・30 秒、59℃・30 秒、74℃・60 秒のサイクルを 35 回繰り返す。増幅産物の確認は、0.8% アガロースゲル電気泳動の後、エチジウムブロマ이드染色によって行なう。

参考例 2 PCR 産物のプラスミドベクターへのサブクローニングおよび挿入 cDNA 部分の塩基配列の解読による増幅 cDNA 配列の確認

参考例 1 で行なう PCR 後の反応産物は 0.8 % の低融点アガロースゲルを用いて分離し、バンドの部分をカミソリで切り出した後、細片化、フェノール抽出、フ

エノール・クロロホルム抽出、エタノール沈殿を行なってDNAを回収する。

PCR-Script™ Amp SK (+) クローニングキット (ストラタジーン社) の処方に従い、回収したDNAをプラスミドベクター-pCR-Script Amp SK (+) ヘサブクロニングする。これをエシエリヒア コリ (*Escherichia coli*) JM109 competent cell (宝酒造) に導入して形質転換した後、cDNA挿入断片を持つクローンをアンピシリンおよびX-galを含むLB寒天培地中で選択し、白色を呈するクローンのみを滅菌したつま楊枝を用いて分離し、形質転換体 *E. coli* JM109/SENR を得る。個々のクローンをアンピシリンを含むLB培地で一晚培養し、QIA prep8 mini prep (キアゲン社) を用いてプラスミドDNAを調製する。調製したDNAの一部を用いて制限酵素Sal I およびSpe I による切断を行ない、挿入されている受容体cDNA断片の大きさを確認する。塩基配列の決定のための反応はDyeDeoxy Terminator Cycle Sequence Kit (パーキンエルマー社) を用いて行ない、蛍光式自動シーケンサーを用いて解読する。得られたクローンの配列を解析し、全ての配列が報告されているヒトGPR14 (=SENR) 遺伝子 (EP 0 859 052 A1) の配列の5'側にSal I 認識配列が付加し、3'側にSpe I 認識配列が付加した遺伝子配列と一致することを確認する。

### 参考例 3 ヒト SENR 発現 CHO 細胞の作製

参考例 2 で配列が確認されるヒト脳由来の SENR の全長アミノ酸配列をコードし5'側にSal I 認識配列が付加し、また3'側にSpe I 認識配列を付加した遺伝子が導入されたプラスミドによって形質転換された *E. coli* のクローンより Plasmid Midi Kit (キアゲン社) を用いてプラスミドを調製し、制限酵素Sal I およびSpe I で切断してインサート部分を切り出す。インサート DNA は電気泳動後、アガロースゲルからカミソリで切り出し、次に細片化、フェノール抽出、フェノール・クロロホルム抽出、エタノール沈殿を行なって回収する。このインサート DNA をSal I およびSpe I で切断した動物細胞発現用ベクタープラスミド pAKKO-111H (Hinuma, S. et al. Biochim. Biophys. Acta, Vol. 1219, pp. 251-259 (1994) 記載の pAKK01.11H と同一のベクタープラスミド) に加え、T4 ライゲース (宝酒造) を用いてライゲーションを行ない、蛋白発現用プラスミ

ド pAKKO-hSENR を構築する。

pAKKO-hSENR で形質転換した *E. coli* DH5 (トヨーボーズ) を培養後、Plasmid Midi Kit (キアゲン社) を用いてpAKKO-SENRのプラスミドDNAを調製する。これをCellPhect Transfection Kit (アマシヤムファルマシアバイオテク社) を用い添付のプロトコルに従ってCHO dhfr<sup>+</sup>細胞に導入する。10 mgのDNAをリン酸カルシウムとの共沈懸濁液とし、24時間前に  $5 \times 10^6$  または  $1 \times 10^6$  個のCHO dhfr<sup>+</sup>細胞を接種した10 cmシャーレに添加する。10%ウシ胎児血清を含むMEMa培地で1日間培養した後、継代し、選択培地である10%透析ウシ胎児血清を含む核酸不含MEMa培地で培養する。選択培地中で増殖してくるヒトSENR発現CHO細胞である形質転換細胞 (CHO/hSENR) のコロニーを選択する。

参考例 4 ラット脳由来cDNAを用いたPCR法によるラットSENR (=GPR14) 受容体cDNAの増幅

ラット脳由来poly (A) +rRNA (クローニング社) を鋳型とし、ランダムプライマーを用いて逆転写反応を行なった。逆転写反応は、タカラRNA PCR ver. 2 キットの試薬を使用した。次にこの逆転写生成物を鋳型として用い、配列番号: 1 および2 の合成DNAプライマーを用いてPCR法による増幅を行なった。合成DNAプライマーは受容体蛋白に翻訳される領域の遺伝子が増幅されるように構築したが、その際に遺伝子の5'側に制限酵素Sal I の認識する塩基配列が付加され、また3'側に制限酵素Spe I の認識する塩基配列が付加されるように、5'側および3'側にそれぞれの制限酵素の認識配列を付加した。反応液の組成は、cDNA 鋳型5 ml、合成DNAプライマー各1  $\mu$ M、0.2 mM dNTPs、1 mM MgCl<sub>2</sub>、KOD (King of DNA) DNAポリメラーゼ1  $\mu$ l および酵素に付属のバッファーで、総反応量は50  $\mu$ l とした。増幅のためのサイクルはサーマルサイクラー (パーキンエルマー社) を用い、94℃・60秒の加熱の後、94℃・30秒、59℃・30秒、74℃・60秒のサイクルを35回繰り返した。増幅産物の確認は、0.8%アガロースゲル電気泳動の後、エチジウムブロマイド染色によって行なった。

参考例 5 PCR産物のプラスミドベクターへのサブクローニングおよび挿入



cDNA部分の塩基配列の解読による増幅cDNA配列の確認

参考例 4 で行なったPCR後の反応産物は0.8 %の低融点アガロースゲルを用いて分離し、バンドの部分のカミソリで切り出した後、細片化、フェノール抽出、フェノール・クロロホルム抽出、エタノール沈殿を行なってDNAを回収した。PCR-Script™ Amp SK(+)クロニングキット (ストラタジーン社) の処方に従い、回収したDNAをプラスミドベクター-pCR-Script Amp SK(+)へサブクローニングした。これをエシエリヒア コリ (*Escherichia coli*) JM109 competent cell (宝酒造) に導入して形質転換した後、cDNA挿入断片を持つクローンをアムピシリンおよびX-galを含むB寒天培地中で選択し、白色を呈するクローンのみを破壊したつま楊枝を用いて分離し、形質転換体 *E. coli* JM109/SENRを得た。個々のクローンをアムピシリンを含むB培地で一晚培養し、QIA prep8 mini prep (キアゲン社) を用いてプラスミドDNAを調製した。調整したDNAの一部を用いて制限酵素Sal IおよびSpe Iによる切断を行ない、挿入されている受容体cDNA断片の大きさを確認した。塩基配列の決定のための反応はDyeDeoxy Terminator Cycle Sequence Kit (パーキンエルマー社) を用いて行ない、蛍光式自動シーケンサーを用いて解読した。得られた3クローンの配列を解析し全ての配列が報告されているSENR (sensory epithelial neuropeptide-like receptor)のDNA配列 (Tal, M. et al. Biochem. Biophys. Res. Commun., Vol. 209, pp. 752-759 (1995)) の5'側にSal I認識配列が付加し、3'側にSpe I認識配列が付加した遺伝子配列と一致することを確認した。なお、報告されているGPR14遺伝子の配列 (Marchese, A. et al. Genomics, vol. 29, pp. 335-344 (1995)) では開始コードンであるATGのAをI番目としたとき945番目がGであるが、SENRの配列および上記で決定した配列ではCである。

#### 参考例 6 SENR発現CHO細胞の作製

参考例 5 で配列が確認されたラット脳由来のSENRの全長アミノ酸配列をコードし5'側にSal I認識配列が付加し、また3'側にSpe I認識配列が付加した遺伝子が導入されたプラスミドによって形質転換された *E. coli* のクローンより Plasmid Midi Kit (キアゲン社) を用いてプラスミドを調製し、制限酵素Sal I

およびSpe Iで切断してインサート部分を切り出した。インサートDNAは電気泳動後、アガロースゲルからカミソリで切り出し、次に細片化、フェノール抽出、フェノール・クロロホルム抽出、エタノール沈殿を行なって回収した。このインサートDNAをSal IおよびSpe Iで切断した動物細胞発現用ベクタープラスミドPAKKO-IIIH (Hinuma, S. et al. Biochim. Biophys. Acta, Vol. 1219, pp. 251-259 (1994) 記載のPAKKO1.11Hと同一のベクタープラスミド) に加え、T4ライゲース (宝酒造) を用いてライゲーションを行ない、蛋白発現用プラスミドPAKKO-SENRを構築した。

PAKKO-SENRで形質転換した *E. coli* DH5 (トローボー) を培養後、Plasmid Midi Kit (キアゲン社) を用いてPAKKO-SENRのプラスミドDNAを調製した。これをCellPect Transfection Kit (アマシヤムファルマシアバイオデクス社) を用いて添付のプロトコルに従ってCHO dhfr細胞に導入した。10  $\mu$ gのDNAをリン酸カルシウムとの共沈懸濁液とし、24時間前に  $5 \times 10^4$  または  $1 \times 10^4$  個のCHO dhfr細胞を播種した10 cmシャーレに添加した。10%ウシ胎児血清を含むMEM  $\alpha$  培地で1日間培養した後、継代し、選択培地である10%透析ウシ胎児血清を含むMEM  $\alpha$  培地で含MEM  $\alpha$  培地で培養した。選択培地中で増殖してくるSENR発現CHO細胞である形質転換細胞のコロニー68クローンを選択した。

#### 実施例 1 ラット脊髄 cDNA の調製

ラット脊髄より Isogen kit (ニッポンジーン社) を用いて total RNA を調製後、Oligotex (dT)<sub>30</sub> (宝酒造) を用いて poly (A)<sup>+</sup>RNA 画分を調製した。この(A)<sup>+</sup>RNA から ThermoScript 逆転写酵素 (ギブコ BRL 社) を用い、マニユアルにしたがって 3'-RACE アダプタープライマー (GGCCACGGCTGCTAGTAC(T)<sub>12</sub>; ギブコ BRL 社) をプライマーに用いて 50°C で逆転写を行ない、一本鎖ラット脊髄 cDNA を作成した。また、同様にマニユアルにしたがって ThermoScript 逆転写酵素 (ギブコ BRL 社) を用い、random hexamer を用いて同じ poly (A)<sup>+</sup>RNA から 50°C で逆転写した cDNA を Marathon cDNA amplification kit (クローンテック社) のマニユアルにしたがって第二ストランドを合成して二本鎖 cDNA とし、キットに付属の Marathon cDNA アダプター配列の付加を行った。

実施例2 PCR法によるラット urotensin II like peptide 前駆体蛋白質をコードする cDNA の部分配列の決定

ヒト urotensin II 前駆体蛋白質をコードする塩基配列 (GenBank accession No. AF104118) の開始コドンにあたる ATG から 265-287 番目の塩基配列および 352-375 番目の塩基配列にそれぞれ基づいて作製した配列番号: 1 および 2 のプライマー (日本バイオサービスに合成委託) を用い、ラット腎臓より実施例 1 で得られた一本鎖 cDNA を鋳型として PCR 反応を行なった。反応液の組成は、プライマー濃度をともに  $2.5 \mu\text{M}$  とし、 $2.5 \text{ mM MgCl}_2$ , dNTP  $0.2 \text{ mM}$ , AmpliTaq Gold (パーキンエルマー社)  $1/200 \text{ volume}$ ,  $10 \text{ 倍濃縮 AmpliTaq Gold Buffer } 1/10 \text{ volume}$ , 液量は  $25 \mu\text{l}$  とした。PCR の条件は、 $95^\circ\text{C}$  で 9 分間保温した後、 $94^\circ\text{C}$  ・ 20 秒、 $60^\circ\text{C}$  ・ 15 秒、 $80^\circ\text{C}$  ・ 20 秒のサイクルを 3 回、 $94^\circ\text{C}$  ・ 20 秒、 $58^\circ\text{C}$  ・ 15 秒、 $80^\circ\text{C}$  ・ 20 秒のサイクルを 5 回、 $94^\circ\text{C}$  ・ 20 秒、 $55^\circ\text{C}$  ・ 15 秒、 $80^\circ\text{C}$  ・ 20 秒のサイクルを 7 回、 $94^\circ\text{C}$  ・ 20 秒、 $53^\circ\text{C}$  ・ 15 秒、 $80^\circ\text{C}$  ・ 20 秒のサイクルを 30 回繰り返した。PCR 反応液を  $3.5\%$  Nusieve GTG Agarose (宝酒造) を用いて電気泳動し、エチジウムブロマイドによる染色によって検出される  $110 \text{ bp}$  付近のバンドから GeneClean Spin kit (バイオ 101 社) によって DNA を抽出した。これを TOPO TA cloning kit (インビトロジェン社) を用いてプラスミドベクター pcrII にサブクローニングし、大腸菌 XL10-Gold (ストラタジェン社) に導入した。生じた形質転換体から QIA prep8 mini prep kit (キアゲン社) を用いてプラスミド DNA を精製した。塩基配列決定のための反応は DyeDeoxy Terminator Cycle Sequence kit (パーキンエルマー社) を用いて行ない、蛍光式自動シーケンサーを用いて解読した。その結果、配列番号: 3 に示す塩基配列が得られた。この配列はヒト urotensin II 前駆体蛋白質遺伝子の塩基配列に相同性が認められ、urotensin II に類似したペプチドの前駆体蛋白質をコードしていることが示唆された。しかし、別にラット染色体配列から決定したラット urotensin II (ラット SENR ligand) 前駆体蛋白質遺伝子の部分配列 (WO 00/32627 に記載) とは異なっていた。そこで、この配列はラット urotensin II の前駆体蛋白質ではなく、これとは別なラット urotensin II 類似のペプチドの前駆体蛋白質をコード

する cDNA の部分配列であると結論された。このラット urotensin II に類似したペプチドをラット urotensin II like peptide と命名した。

実施例3 RACE (rapid amplification of cDNA ends) 法によるラット urotensin II like peptide 前駆体蛋白質をコードする cDNA 配列の決定

ラット urotensin II like peptide 前駆体蛋白質をコードする遺伝子の両側の配列を決定するため、実施例 1 で得た二本鎖 cDNA 調製液を Marathon cDNA amplification kit (クロンテック社) の指示のとおり 25 倍希釈して  $2.5 \mu\text{l}$  を鋳型にし、配列番号: 4 (日本バイオサービスに合成委託) のプライマーおよびキットに付属のアダプタープライマー-API を用いて PCR を行なった。反応液の組成は、プライマー濃度を配列番号: 4 を  $0.4 \mu\text{M}$ , API を  $0.2 \mu\text{M}$  とし、 $2.5 \text{ mM MgCl}_2$ , dNTP  $0.2 \text{ mM}$ , AmpliTaq Gold (パーキンエルマー社)  $1/100 \text{ volume}$ ,  $10 \text{ 倍濃縮 AmpliTaq Gold Buffer } 1/10 \text{ volume}$ , 液量は  $25 \mu\text{l}$  とした。PCR の条件は、 $95^\circ\text{C}$  で 9 分保温した後、 $94^\circ\text{C}$  ・ 20 秒、 $70^\circ\text{C}$  ・ 1 分のサイクルを 3 回、 $94^\circ\text{C}$  ・ 20 秒、 $68^\circ\text{C}$  ・ 1 分のサイクルを 5 回、 $94^\circ\text{C}$  ・ 20 秒、 $66^\circ\text{C}$  ・ 1 分のサイクルを 25 回、繰り返した。この反応液  $1 \mu\text{l}$  を鋳型にし、配列番号: 5 (日本バイオサービスに合成委託) のプライマーおよびキットに付属のアダプタープライマー-API2 を用いて再度 PCR を行なった。反応液の組成は、プライマー濃度を配列番号: 5 を  $0.4 \mu\text{M}$ , API2 を  $0.2 \mu\text{M}$  とし、 $2.5 \text{ mM MgCl}_2$ , dNTP  $0.2 \text{ mM}$ , AmpliTaq Gold (パーキンエルマー社)  $1/100 \text{ volume}$ ,  $10 \text{ 倍濃縮 AmpliTaq Gold Buffer } 1/100 \text{ volume}$ , 液量は  $25 \mu\text{l}$  とした。PCR の条件は、 $95^\circ\text{C}$  で 9 分保温した後、 $94^\circ\text{C}$  ・ 20 秒、 $64^\circ\text{C}$  ・ 30 秒のサイクルを 35 回繰り返した後、 $72^\circ\text{C}$  ・ 7 分保温した。PCR 反応液を  $3.5\%$  Nusieve GTG Agarose (宝酒造) を用いて電気泳動して、エチジウムブロマイドによる染色によって検出される  $420 \text{ bp}$  付近のバンドから GeneClean Spin kit (バイオ 101 社) によって DNA を抽出し、TOPO TA cloning kit (インビトロジェン社) を用いてサブクローニングを行なった。生じた形質転換体から QIA prep8 mini prep kit (キアゲン社) を用いてプラスミド DNA を精製した。塩基配列決定のための反応は DyeDeoxy Terminator Cycle Sequence kit (パーキンエルマー社) を用いて行ない、蛍光式自動シーケンサーを用いて

解読したところ、配列番号：6 に示す配列が得られた。この配列にはラット urotensin II like peptide 前駆体蛋白質をコードする cDNA の開始コドンを含む 5'末端側の配列が含まれていた。

- 5 ラット urotensin II like peptide 前駆体蛋白質をコードする cDNA の 3'末端側の配列を決定するため、実施例 1 で調製したラット腎臓由来一本鎖 cDNA 50 ng を鋳型にし、配列番号：7 (日本バイオサービスに合成委託) のプライマーおよび Abridged Universal Amplification Primer (ギブコ BRL 社) を用いて PCR を行った。反応液量は 50  $\mu$  l で反応液の組成は、プライマー濃度を 0.2  $\mu$  M とし、dNTP 0.2 mM、Advantage2 (クロンテック社) 1/50 volume、10 倍濃縮 Advantage2 Buffer 1/10 volume、57°C・30 秒、72°C・2 分のサイクルを 30 回繰り返した後、94°C・30 秒、55°C・30 秒、72°C・2 分のサイクルを 30 回繰り返した後、72°C で 10 分保温した。反応液の一部を 1.6% Seakem GTG Agarose (宝酒造) で電気泳動して 0.4 N NaOH で変性させ、BYODYNE B Transmembrane (ポールバイオサポート社) にアルカリブロットニングを行った。この膜を 0.2 M リン酸緩衝液 pH 6.8 で中和した後、風乾し、0.12  $\mu$ l/cm<sup>2</sup> の紫外線を当てて 80°C で 30 分加温した。この膜に対して T4 キナーゼにより [<sup>32</sup>P]ATP 標識した配列番号：8 のプロンプをハイブリダイズさせ、65°C の 0.1% SDS を加えた 0.2 x SSC (ニッポンジーン社) で洗浄後、BAS2000 (富士フイルム社) により放射活性がハイブリダイズしている位置を調べたところ、300-400 bp にラット urotensin II like peptide 前駆体蛋白質遺伝子由来と考えられる増幅産物が泳動されていることが認められた。そこでこの部分のゲルから QIAGEN Gel Extraction kit (キアゲン社) によって DNA を抽出し、これを TOPO TA cloning kit (インビトロジェン社) を用いてプラスミドベクター-pcrII にサブクローニングして大腸菌 XL10-Gold (ストラタジーン社) に導入した。生じた形質転換体から QIA prep8 mini prep kit (キアゲン社) を用いてプラスミド DNA を精製した。塩基配列決定のための反応は、DyeDeoxy Terminator Cycle Sequence kit (パーキンエルマー社) を用いて行ない、蛍光式自動シーケンサーを用いて解読した。その結果、ラット urotensin II like peptide 前駆体蛋白質をコードする cDNA の終止コドンを含む 3'末端側の配列である配列番号：9 が得られた。

- 5 上に述べたようにして RACE 法を用いて得られた 5'末端側および 3'末端側の配列情報から予想されるラット urotensin II like peptide 前駆体蛋白質をコードする cDNA の全長を含む配列を得るため、実施例 1 で得られた腎臓由来一本鎖 cDNA を鋳型とし、配列番号：10 および配列番号：11 のプライマー (アマシヤムファルマシアバイオテク社に合成委託) を用いて PCR を行なった。反応液の組成は、プライマー濃度をともに 0.2  $\mu$  M とし、dNTP 0.2 mM、Advantage2 (クロンテック社) 1/50 volume、10 倍濃縮 Advantage2 Buffer 1/10 volume、57°C・30 秒、72°C・30 秒のサイクルを 30 回繰り返した後、94°C・30 秒、57°C・30 秒、72°C・30 秒のサイクルを 30 回繰り返した後、72°C で 10 分保温した。PCR 反応液を 1.6% Seakem GTG Agarose (宝酒造) を用いて電気泳動し、サイバードグリーン (ニッポンジーン社) による染色によって検出される 450 bp 付近のバンドから QIAGEN Gel Extraction kit (キアゲン社) によって DNA を抽出して TOPO TA cloning kit (インビトロジェン社) を用いてサブクローニングを行なった。生じた形質転換体から QIA prep8 mini prep kit (キアゲン社) を用いてプラスミド DNA を精製した。塩基配列決定のための反応は DyeDeoxy Terminator Cycle Sequence kit (パーキンエルマー社) を用いて行ない、蛍光式自動シーケンサーを用いて解読した。その結果、配列番号：12 に示す配列が得られた。この配列にはラット urotensin II like peptide 前駆体蛋白質をコードする cDNA の開始コドンと終止コドンを含む全長配列が含まれていた。このラット urotensin II like peptide 前駆体蛋白質をコードする cDNA が挿入された plasmid pcrII-rull like で大腸菌 XL10-Gold (ストラタジーン社) を形成して大腸菌 XL10-Gold/pcrII-rull like を得た。
- 10 配列番号：12 の塩基配列から翻訳されるラット urotensin II like peptide 前駆体蛋白質のアミノ酸配列を配列番号：13 として示した。また、図 1 にラット urotensin II like peptide 前駆体の DNA 配列および対応するアミノ酸配列を示した。この前駆体蛋白質配列から予想される成熟ペプチドである urotensin II like peptide は、染色体配列から予想された 12 残基のアミノ酸からなるラット urotensin II とは異なり、成熟ペプチドを切り出す切断部位が 5 残基または 2 残基 N 末側にあるため 17 残基または 14 残基であると推定された。17 残基

からなる urotensin II like peptide をラット urotensin II like peptide-1、また 14 残基からなる urotensin II like peptide をラット urotensin II like peptide-2 とよぶ。また、予想される成熟ペプチドの N 末端がグルタミンであるため実際のペプチドの N 末端はピログルタミン酸であると考えられた。配列番号：14 および 15 に予想されるラット urotensin II like peptide-1 および -2 の配列を示した。ただし、ここで想定した成熟ペプチドの切断部位は非典型的であることから、前駆体蛋白のアミノ酸配列の 103 番目あるいは 99 番目の Arg 残基を切断部位とした場合は、さらに N 末の長い 20 残基からなる配列番号：31 に示す配列または 24 残基からなる配列番号：32 に示す配列が成熟ペプチドの構造として考えられる。

10

#### 実施例 4 マウス腎髄 cDNA の調製

マウス腎髄より Isogen kit (ニッポンジーン社) を用いて total RNA を調製後、Oligotex (dT)<sub>30</sub> (宝酒造) を用いて poly (A)<sup>+</sup>RNA 画分を調製した。この poly (A)<sup>+</sup>RNA から ThermoScript 逆転写酵素 (ギブコ BRL 社) を用い、マニユアルにしたがって oligo dT プライマーを用いて 60℃ で逆転写を行なってマウス腎髄 cDNA を作製した。

15

実施例 5 PCR 法によるマウス urotensin II like peptide 前駆体蛋白質をコードする cDNA の部分配列の決定

20

マウス urotensin II like peptide 前駆体蛋白質をコードする cDNA の 5' 末端側の配列を決定するためにラット urotensin II like peptide 前駆体蛋白質 cDNA の 5' 末端側非翻訳領域の開始コドンの上流 14 塩基から 35 塩基の配列に相当するプライマー (配列番号：16) およびラット urotensin II like peptide の C 末端領域を参考に作成したプライマー (配列番号：19) を用い、実施例 4 で逆転写したマウス腎髄 cDNA のうち 30 ng mRNA 相当分を鋳型として PCR 反応を行った。反応液の組成は、プライマー濃度をともに 0.4 μM とし、2.5 mM MgCl<sub>2</sub>、dNTP 0.2 mM、AmpliTaq Gold (パーキンエルマー社) 1/100 volume、10 倍濃縮 AmpliTaq Gold Buffer 1/10 volume、液量は 20 μl とした。PCR の条件は、

25

95℃ で 9 分間保温した後、95℃・10 秒、57℃・15 秒、72℃・30 秒のサイクルを 5 回、95℃・10 秒、54℃・15 秒、72℃・30 秒のサイクルを 40 回繰り返して、72℃ で 7 分間保温した。PCR 反応液を 3.5% Nusieve GTG Agarose (宝酒造) を用いて電気泳動し、エチジウムブロマイドによる染色によって検出される 420 bp 付近のバンドから GeneClean Spin kit (バイオ 101 社) によって DNA を抽出した。これを TOP0 TA cloning kit (インビトロジェン社) を用いてプラスミドクター-per2.1 にサブクローニングし、大腸菌 TOP10 に導入した。生じた形質転換体から QIA prep8 mini prep kit (キアゲン社) を用いてプラスミド DNA を精製した。塩基配列決定のための反応は dRhodamine Terminator Cycle Sequencing kit (パーキンエルマー社) を用いて行ない、蛍光式自動シーケンサーを用いて解読した。その結果、配列番号：20 に示す塩基配列が得られた。この配列はラット urotensin II like peptide 前駆体蛋白質遺伝子の塩基配列に高い相同性が認められ、マウス urotensin II like peptide 前駆体蛋白質遺伝子の 5' 末端側部分配列であると考えられた。

10

15

また、マウス urotensin II like peptide 前駆体蛋白質をコードする cDNA の 3' 末端側の配列を決定するためにラット urotensin II like peptide 前駆体蛋白質の Gly<sup>98</sup>-Arg<sup>99</sup> 領域を参考に作成したプライマー (配列番号：21) およびラット urotensin II like peptide 前駆体蛋白質 cDNA の 3' 末端側非翻訳領域の終止コドンの下流 22 塩基から 43 塩基の配列に相当するプライマー (配列番号：22) を用い、実施例 4 で逆転写した cDNA のうち 30 ng mRNA 相当分を鋳型とし

20

PCR 反応を行なった。反応液の組成は、プライマー濃度をともに 0.4 μM とし、dNTP 0.2 mM、ExTaq (宝酒造) 1/50 volume、10 倍濃縮 ExTaq Buffer 1/10 volume、液量は 20 μl とした。PCR の条件は、95℃ で 1 分間保温した後、95℃・10 秒、47℃・15 秒、72℃・30 秒のサイクルを 40 回繰り返して、72℃ で 7 分間保温した。PCR 反応液を 3.5% Nusieve GTG Agarose (宝酒造) を用いて電気泳動し、

25

エチジウムブロマイドによる染色によって検出される 170 bp 付近のバンドから Mermaid Spin kit (バイオ 101 社) によって DNA を抽出した。これを TOP0 TA cloning kit (インビトロジェン社) を用いてプラスミドクター-per2.1 にサブクローニングし、大腸菌 TOP10 に導入した。生じた形質転換体から QIA prep8

mini prep kit (キアゲン社) を用いてプラスミド DNA を精製した。塩基配列決定のための反応は dRhodamine Terminator Cycle Sequence kit (パーキンエルマー社) を用いて行ない、蛍光式自動シーケンサーを用いて解読した。その結果、配列番号: 23 に示す塩基配列が得られた。この配列は、上に得られた配列番号: 20 と約 50 塩基に亘って一致し、またラット urotensin II like peptide 前駆体蛋白質遺伝子の塩基配列に高い相同性が認められたのでマウス urotensin II like peptide 前駆体蛋白質遺伝子の 3'末端側部分配列であると考えられた。

実施例 6 PCR 法によるマウス urotensin II like peptide 前駆体蛋白質をコードする cDNA の全長配列の取得

上に述べたようにして得られた 5'末端側および 3'末端側の配列情報から予想されるマウス urotensin II like peptide 前駆体蛋白質をコードする cDNA の全長を含む配列を得るため、配列番号: 24 および実施例 5 に記載の 3'末端側部分配列を取得するのに用いた配列番号: 22 のプライマーを用い、実施例 4 で逆転写したマウス脊髄 cDNA のうち 30 ng mRNA 相当分を鋳型として PCR 反応を行なった。反応液の組成は、プライマー濃度をともに 0.4  $\mu$ M とし、dNTP 0.2 mM、ExTaq (宝酒造) 1/50 volume、10 倍濃縮 ExTaq Buffer 1/10 volume、液量は 20  $\mu$ l とした。PCR の条件は、94℃で 2 分間保温した後、95℃・10 秒・47℃・15 秒、72℃・30 秒のサイクルを 40 回繰り返して、72℃で 10 分間保温した。PCR 反応液を 3.5% Nusieve GTG Agarose (宝酒造) を用いて電気泳動し、エチジウムブロマイドによる染色によって検出される 430 bp 付近のバンドから GeneClean Spin kit (バイオ 101 社) によって DNA を抽出した。これを TOPOTA cloning kit (インビトロジェン社) を用いてプラスミドベクター-pcr2.1 にサブクローニングし、大腸菌 TOP10 に導入した。生じた形質転換体から QIA prep8 mini prep kit (キアゲン社) を用いてプラスミド DNA を精製した。塩基配列決定のための反応は dRhodamine Terminator Cycle Sequence kit (パーキンエルマー社) を用いて行ない、蛍光式自動シーケンサーを用いて解読した。その結果、配列番号: 25 に示す配列が得られた。この配列にはマウス urotensin II like peptide

前駆体蛋白質をコードする cDNA の開始コドンと終止コドンを含む全長配列が告げられていた。このマウス urotensin II like peptide 前駆体蛋白質をコードする cDNA が挿入された plasmid pcr2.1-milP で大腸菌 TOP10 (インビトロジェン社) を形質転換して大腸菌 XL10-Gold/pcr2.1-milP を得た。

配列番号: 25 の塩基配列から翻訳されるラット urotensin II like peptide 前駆体蛋白質のアミノ酸配列を配列番号: 26 として示した。また、図 2 にマウス urotensin II like peptide 前駆体の DNA 配列および対応するアミノ酸配列を示した。この前駆体蛋白質配列から予想される成熟ペプチドであるマウス urotensin II like peptide は、ラット urotensin II like peptide-I と同様に 17 残基であると推定された。また、予想される成熟ペプチドの N 末端がグルタミンであるため実際のペプチドの N 末端はピログルタミン酸であると考えられた。配列番号: 27 に予想されるマウス urotensin II like peptide の配列を示した。

ただし、ラットの場合と同様、ここで想定した成熟ペプチドの切断部位は非典型的であることから、前駆体蛋白質のアミノ酸配列の 103 番目あるいは 99 番目の Arg 残基を切断部位とした場合は、さらに N 末の長い 20 残基からなる配列番号: 33 に示す配列または 24 残基からなる配列番号: 34 に示す配列が成熟ペプチドの構造として考えられる。

実施例 7 ラット urotensin II like peptide-I: pGlu-Arg-Lys-Gln-His-Gly-Thr-Ala-Pro-Glu-Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Ile-OH (配列番号: 14) の製造  
市販 Boc-Ile-OCH<sub>2</sub>-PAM 樹脂 (0.746 mmole/g resin) 0.5 mmole 分をペプチド合成機 ABI 430A の反応槽に入れ、Boc-strategy (NMP-HOBT) ペプチド合成方法で Boc-Cys(MeBzl), Boc-Tyr(Br-Z), Boc-Lys(1-Z), Boc-Trp(CH<sub>3</sub>O), Boc-Phe, Boc-Cys(MeBzl), Boc-Glu(OcHex), Boc-Pro, Boc-Ala, Boc-Thr(Bzl), Boc-Gly, Boc-His(Bom), Boc-Gln, Boc-Lys(1-Z), Boc-Arg(Tos), Z-pGlu を順に導入し目的の保護ペプチド樹脂を得た。この樹脂を p-クレゾール、1,4-ブタンジチオールと共に無水弗化水素中、0℃ 60 分攪拌した後、弗化水素を減圧留去し、残留物ヘジエチルエーテルを加え沈殿を濾過した。この沈殿に 5

0%酢酸水を加え抽出し、不溶部分を十分に濃縮後、50%酢酸水で充填したセファデックス™ G-25 カラム (2.0 x 80 cm) に付し、同溶液で展開、主要画分を集め LiChroprep™ RP-18 を充填した逆相クロマトカラム (2.6 x 60 cm) に付け 0.1% TFA 水 200ml で洗浄、0.1% TFA 水 300ml と 0.1% TFA 含有 40% アセトニトリル水 300ml を用いた線型勾配溶出を行い、主要画分を集め濃縮した。これを 2% 酢酸水に  $5 \times 10^{-4}$  モル/L 程度の濃度で溶解し、アンモニウム水を用い pH7.5 に調整後、緩やかに空気を吹込み攪拌した。反応を HPLC で追跡し、SH 体ペプチドのピークがすべてジスルフィド体に変化した事を確認後、酢酸を加え溶液の pH を 3 に調整し、上記 LiChroprep™ RP-18 カラムに吸着した。カラムを 0.1% TFA 水 200ml で洗浄後、0.1% TFA 水 300ml と 0.1% TFA 含有 50% アセトニトリル水 300ml を用いた線型勾配溶出を行い、主要画分を集め、凍結乾燥し白色粉末を得た。

質量分析による (M+H)<sup>+</sup> 2076.12 (計算値 2075.96)

HPLC 溶出時間 18.3 分

15 カラム条件

カラム Wakosil 5C18T 4.6 x 100mm

溶離液: A 液-0.1% TFA 水、B 液-0.1% TFA 含有アセトニトリルを用い A/B:

95/5~45/55 へ直線型濃度勾配溶出 (25 分)

流速: 1.0 ml / 分

20

実施例 8 ラット urotensin II like peptide-1: Gln-Arg-Lys-Gln-His-Gly-Thr-Ala-Pro-Glu-Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Ile-OH (配列番号: 14) の製造

前記製造実施例 7 の 2-pGlu を Boc-Gln に変更し、同様の固相ペプチド合成、脱保護反応、ジスルフィド形成、精製を行った後、目的物を 1/100N-HCl に溶解、ペプチドを塩酸塩として凍結乾燥し白色粉末を得た。

質量分析による (M+H)<sup>+</sup> 2093.20 (計算値 2092.99)

HPLC 溶出時間 17.8 分

カラム条件

カラム Wakosil 5C18T 4.6 x 100mm

溶離液: A 液-0.1% TFA 水、B 液-0.1% TFA 含有アセトニトリルを用い A/B: 95/5~45/55 へ直線型濃度勾配溶出 (25 分)  
流速: 1.0 ml / 分

5 実施例 9 ラット urotensin II like peptide-2: pGlu-His-Gly-Thr-Ala-Pro-Glu-Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Ile-OH (配列番号: 15) の製造

市販 Boc-Ile-OCH<sub>2</sub>-PAN 樹脂 (0.746 mmole/g resin) 0.5 mmole 分をペプチド合成機 ABI 430A の反応槽に入れ、Boc-strategy (NMP-HOBt) ペプチド合成方法で Boc-Cys(MeBzl), Boc-Tyr(Br-Z), Boc-Lys(Cl-Z), Boc-Trp(CHO), Boc-Phe, Boc-Cys(MeBzl), Boc-Glu(OcHex), Boc-Pro, Boc-Ala, Boc-Thr(Bzl), Boc-Gly, Boc-His(Bom), 2-pGlu を順に導入し目的の保護ペプチド樹脂を得た。この樹脂 0.45 g を D-クレゾール、1,4-ブタンジチオールと共に無水弗化水素中、0℃、60 分攪拌した後、弗化水素を減圧留去し、残留物へジエチルエーテルを加え沈殿を透過した。この沈殿に 50% 酢酸水を加え抽出し、不溶部分を除去、抽出液を十分に濃縮後、50% 酢酸水で充填したセファデックス (商品名) G-25 カラム (2.0 x 80 cm) に付し、同溶液で展開、主要画分を集め LiChroprep (商品名) RP-18 を充填した逆相クロマトカラム (2.6 x 60 cm) に付け 0.1% TFA 水 200 ml で洗浄、0.1% TFA 水 300 ml と 0.1% TFA 含有 40% アセトニトリル水 300 ml を用いた線型勾配溶出を行い、主要画分を集め濃縮した。これを約 4 ml の酢酸に

15

20

25

質量分析による (M+H)<sup>+</sup> 1664.1 (計算値 1663.7)

HPLC 溶出時間 19.9 分

カラム条件

カラム Wakosil 5C18T 4.6 x 100mm

溶離液：A液-0.1% TFA 水、B液-0.1% TFA 含有アセトニトリルを用い、A/B：  
95/5～45/55へ直線型濃度勾配溶出（25分）

流速：1.0 ml / 分

5 実施例 10 ラット urotensin II like peptide-2：Gln-His-Gly-Thr-Ala-Pro-Glu-Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Ile-OH（配列番号：15）の製造

前記製造実施例9の固相ペプチド合成のZ-pGluをBoc-Glnに変更し、同様に脱保護反応、ジスルフィド形成、精製を行った後、目的物を1/100N-HClに溶解、ペプチドを塩酸塩として凍結乾燥し白色粉末を得た。

10 質量分析による(M+H)<sup>+</sup> 1680.92（計算値1680.73）

HPLC 溶出時間 19.3分

カラム条件

カラム Wakosil 5C18T 4.6 x 100mm

15 溶離液：A液-0.1% TFA 水、B液-0.1% TFA 含有アセトニトリルを用い A/B：  
95/5～45/55へ直線型濃度勾配溶出（25分）

流速：1.0 ml / 分

実施例 11 マウス urotensin II like peptide：pGlu-His-Lys-Gln-His-Gly-Ala-Ala-Pro-Glu-Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Ile（配列番号：27）の製造

20 実施例7に記載のラット urotensin II like peptide-1の製造中のBoc-Thr(Bzl)をBoc-AlaにBoc-Arg(Tos)をBoc-His(Bom)に代え同様の固相ペプチド合成、脱保護反応、ジスルフィド形成、精製を行い凍結乾燥し白色粉末を得た。

質量分析による(M+H)<sup>+</sup> 2027.11（計算値2026.91）

25 HPLC 溶出時間 18.9分

カラム条件

カラム Wakosil 5C18T 4.6 x 100mm

溶離液：A液-0.1% TFA 水、B液-0.1% TFA 含有アセトニトリルを用い A/B：  
95/5～45/55へ直線型濃度勾配溶出（25分）

流速：1.0 ml / 分

実施例 12 マウス urotensin II like peptide：Gln-His-Lys-Gln-His-Gly-Ala-Ala-Pro-Glu-Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Ile（配列番号：27）の製造

5 実施例8に記載のラット urotensin II like peptide-1の製造中のBoc-Thr(Bzl)をBoc-AlaにBoc-Arg(Tos)をBoc-His(Bom)に代え同様の固相ペプチド合成、脱保護反応、ジスルフィド形成、精製を行った後、目的物を1/100N-HClに溶解、ペプチドを塩酸塩として凍結乾燥し白色粉末を得た。

質量分析による(M+H)<sup>+</sup> 2044.07（計算値2043.93）

10 HPLC 溶出時間 18.5分

カラム条件

カラム Wakosil 5C18T 4.6 x 100mm

溶離液：A液-0.1% TFA 水、B液-0.1% TFA 含有アセトニトリルを用い A/B：  
95/5～45/55へ直線型濃度勾配溶出（25分）

15 流速：1.0 ml / 分

実施例 13 合成ラット urotensin II like peptide-1およびurotensin II like peptide-2のCHO/rSENR細胞株に対するアラキドン酸代謝物遊離促進活性

20 実施例9で合成したラット urotensin II like peptide-2（配列番号：15）が示すラット SENR 発現 CHO 細胞に対するアラキドン酸代謝物放出活性を以下の方法により測定した。

CHO/rSENR 細胞（WO 00/32627に記載のCHO/SENR細胞と同一の細胞）をプレートに5 x 10<sup>4</sup> cell/wellで播種し、24時間培養後、[<sup>3</sup>H]アラキドン酸を0.25 μCi/wellとなるよう添加した。[<sup>3</sup>H]アラキドン酸添加16時間後、細胞を0.05% ウシ血清アルブミン（BSA）を含むハンクス氏液（HBSS）で洗浄し、各wellに合成ラット urotensin II like peptideを加えた0.05% BSA含有HBSS 500 μlを添加した。37℃で30分間インキュベートした後に、反応液500 μlから350 μlをシンチレーターに加え、反応中に遊離された[<sup>3</sup>H]アラキドン酸代謝物の量をシンチレーションカウンターにより測定した。その結果、ラット urotensin II

like peptide によってベプチドの濃度依存的にアラキドン酸代謝物の培地中への放出が確認された (図 3)。このときの  $EC_{50}$  値は  $1.1 \text{ nM}$  であった。また、同様の活性は、実施例 7 で合成したラット urotensin II like peptide-1 (配列番号: 14) を投与した場合にも確認された ( $EC_{50}$  値は  $1.7 \text{ nM}$ )。さらに、同様の活性はマウス urotensin II like peptide (配列番号: 27) を投与した場合にも確認される。また、ラット urotensin II like peptide-1 および 2 あるいはマウス urotensin II like peptide をヒト SENR 発現 CHO 細胞 (WO 00/32627 に記載の CHO/hSENR 細胞) に対して投与した場合にも確認される。

10 実施例 14 合成ラット urotensin II like peptide-1 および urotensin II like peptide-2 の麻酔下ラットの血圧に対する作用

実施例 9 で合成したラット urotensin II like peptide-2 (配列番号: 15) の麻酔下ラットの血圧に対する作用を以下の方法により測定した。8-9 週齢の雄性 Wistar rat (日本チャールスリバーより購入) をネンブータル注射液 (大日本製薬、50 mg/ml sodium pentobarbital, 50 mg/kg 腹腔内投与) により麻酔し、トランスデュサーに接続した血圧測定用カテーテル (SP-55) を左頸動脈に、静脈投与用カテーテル (SP-35) を左大腿動脈にそれぞれ挿入した。合成ラット urotensin II like peptide-2 は 0.05% BSA を含む生理的食塩水に溶解し、10 nmol/kg となるように左大腿静脈より投与した。血圧は連続してポリグラフ (NEC 三栄社) で記録した。ラットの血圧はベプチドの投与によって低下し、ラット urotensin II like peptide-2 は降圧作用を示した。ラット urotensin II like peptide-2 を 10 nmol/kg 投与したときの投与前の平均血圧に比べた低下血圧は約 35 mmHg であった。また、同様の活性は、実施例 7 で合成したラット urotensin II like peptide-1 (配列番号: 14) を投与した場合にも確認された。ラット urotensin II like peptide-1 を 10 nmol/kg 投与したときの投与前の平均血圧に比べた低下血圧は約 33 mmHg であった。さらに、同様の活性はマウス urotensin II like peptide (配列番号: 27) を投与した場合にも確認される。

実施例 15 合成ラット urotensin II like peptide-1 のラット頸動脈に対する

# 収縮作用

実施例 7 で合成したラット urotensin II like peptide-1 (配列番号: 14) のラット胸部大動脈に対する作用を以下の方法により測定する。9-12 週齢の雄性 Wistar rat (日本チャールスリバーより購入) をネンブータル注射液 (大日本製薬、50 mg/ml sodium pentobarbital, 50 mg/kg 腹腔内投与) により麻酔し、胸部大動脈より全採血して失血死させる。このラットより胸部大動脈を摘出し、幅 5 mm のリング標本を作製する。標本を混合ガス (95%  $O_2$ -5%  $CO_2$ ) を通気して 37°C に保温した Krebs-Henseleit 溶液 (NaCl 118 mM, KCl 4.7 mM,  $CaCl_2$  2.5 mM,  $KH_2PO_4$  1.2 mM,  $NaHCO_3$  25 mM,  $MgSO_4$  1.2 mM, glucose 10.0 mM) 3 ml を満たしたオーガンバス中に懸垂し、等尺性収縮強力を微小荷重変換器 (UL-10GR、ミネベア社) を介してポリグラフ (NEC 三栄社) で記録する。静止張力は約 0.5 g とする。内皮の存在は、 $10^{-6} \text{ M}$  norepinephrine 投与によって惹起した収縮が  $10^{-4} \text{ M}$  acetylcholine 投与によって弛緩することを観察することによって確認する。ラット urotensin II like peptide-1 は終濃度  $10^{-10} - 10^{-2} \text{ M}$  となるように累積投与する。ラット頸動脈リング標本はラット urotensin II like peptide-1 の添加によって用量依存的に収縮する。また、同様の活性はラット urotensin II like peptide-2 (配列番号: 15) あるいはマウス urotensin II like peptide (配列番号: 27) を投与した場合にも確認される。

20 実施例 16 ラット urotensin II like peptide-1 が誘起するラット SENR 発現 CHO 細胞膜画分への GTP  $\gamma$  S 結合活性の測定

実施例 7 で合成したラット urotensin II like peptide-1 (配列番号: 14) のラット SENR 発現 CHO 細胞膜画分に対する [ $^{32}S$ ]-guanosine 5'-( $\gamma$ -thio)triphosphate の結合促進活性を以下の方法により測定する。最初に膜画分の調製法を記載する。1 x  $10^6$  個の CHO/rSENR 細胞に 10 ml のホモジネートバッファー (10 mM  $NaHCO_3$ , 5 mM EDTA, 0.5 mM PMSF, 1  $\mu$ g/ml pepstatin, 4  $\mu$ g/ml E64, 20  $\mu$ g/ml leupeptin) を添加し、ポリトロン (12,000 rpm, 1 分間) を用いて破砕する。細胞破砕液を遠心 (1,000 g, 15 分間) して上清を得る。次にこの上清を超遠心分離 (Beckman type 30 ローター、30,000 rpm, 1 時間) し、得



られた沈降物をラット SENR 発現 CHO 細胞膜画分とする。

GTP  $\gamma$  S 結合活性の測定は以下の通りである。ラット SENR 発現 CHO 細胞膜画分を膜希釈緩衝液 (50 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.4), 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 150 mM NaCl, 1  $\mu$  M GDP) で希釈して、タンパク質濃度 30  $\mu$ g/ml のアッセイ用細胞膜画分溶液をつくる。アッセイ用膜画分溶液 200  $\mu$ l に、51.5 nM の濃度の [<sup>35</sup>S]-guanosine 5'-( $\gamma$ -thio)triphosphate (NEN 社) を 2  $\mu$ l と種々の濃度のラット urotensin II like peptide を 2  $\mu$ l 添加し、この混合液を 25°C で一時間保温する。混合液をフィルター透過し、さらにフィルター洗浄用バッファ (50 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.4), 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EDTA, 0.1% BSA) 1.5 ml で 2 回洗浄した後、フィルターの放射活性を液体シンチレーションカウンタで測定する。ラット urotensin II like peptide-1 は、用量依存的に、膜画分に結合する [<sup>35</sup>S]-guanosine 5'-( $\gamma$ -thio)triphosphate 量を増大させる。また、同様の活性はラット urotensin II like peptide-2 (配列番号: 15) あるいはマウス urotensin II like peptide (配列番号: 27) を投与した場合にも確認される。また、ラット urotensin II like peptide-1 および-2 あるいはマウス urotensin II like peptide を上記と同様にして作製したヒト SENR 発現 CHO 細胞の膜画分に投与した場合にも確認される。

#### 実施例 17 アイソトープ標識ラット urotensin II like peptide-1 の作製

結合阻害実験に使用するためのアイソトープ標識ラット urotensin II like peptide-1 を以下のようにして作製した。実施例 7 で合成したラット urotensin II like peptide-1 (配列番号: 14) 5  $\mu$ g を 25  $\mu$ l の 0.4 M 酢酸ナトリウム (pH 5.6) に溶解し、これに 200 ng のラクトパーオキシダーゼ (和光純薬) を加えた後、1 mCi の [<sup>125</sup>I]-ヨウ化ナトリウム (アマシヤムファーマシアバイオテク社) および 200 ng の過酸化水素 (10  $\mu$ l) を加えた。室温で 10 分間静置した後、さらに 200 ng の過酸化水素 (10  $\mu$ l) を加えて 10 分間静置した。これを TSKgel ODS-80T, カラム (4.6 mm x 25 cm, トーソー) を用いた HPLC によって精製し、[<sup>125</sup>I]標識ラット urotensin II like peptide-1 を得た。また、同様の [<sup>125</sup>I]標識ペプチドはラット urotensin II like peptide-2 (配列番号: 15) あ

るいはマウス urotensin II like peptide (配列番号: 27) についても同様の操作を行なって作製することが出来る。

実施例 18 アイソトープ標識ラット urotensin II like peptide-1 と CHO/rSENR 細胞を使用した結合阻害実験

実施例 17 で作製した [<sup>125</sup>I]標識ラット urotensin II like peptide-1 とラット SENR 発現 CHO 細胞を使用した結合阻害実験の方法を以下に示す。CHO 細胞を 24 穴プレートに 5 x 10<sup>4</sup> cell/well で播種して 48 時間培養し、その後細胞を 0.05% BSA を含む MEM  $\alpha$  培地 0.5ml で洗う (以下 0.05% BSA を含む MEM  $\alpha$  培地を反応用バッファと呼ぶ)。総結合を調べるために 10 pM [<sup>125</sup>I]標識ラット urotensin II like peptide-1 を含む反応用バッファ、非特異的結合を調べるために 10 pM [<sup>125</sup>I]標識ラット urotensin II like peptide-1 と 1  $\mu$ M アイソトープ標識ラット urotensin II like peptide-1 を含む反応用バッファ、さらにラット SENR に対する結合活性を調べる試料と 10 pM [<sup>125</sup>I]標識ラット urotensin II like peptide-1 を含む反応用バッファ、各 0.5 ml をそれぞれ細胞に添加し、室温で 30 分間反応させる。細胞を反応用バッファで洗浄した後、0.5 N NaOH を 0.2 ml 添加して細胞を溶解し、溶解物の放射活性をガンマカウンタにより測定する。特異的結合は、総結合から非特異的結合を減じた値である。被験試料のラット SENR 結合活性は、総結合から試料を加えた細胞溶解物の放射活性を減じた値の特異的結合に対する比率で示される。また、同様の結合阻害実験は [<sup>125</sup>I]標識したラット urotensin II like peptide-2 (配列番号: 15) あるいはマウス urotensin II like peptide (配列番号: 27) を用いても実施することができる。また、[<sup>125</sup>I]した標識ラット urotensin II like peptide-1 および-2 あるいはマウス urotensin II like peptide とヒト SENR 発現 CHO 細胞を用いても実施することができる。

実施例 19 アイソトープ標識ラット urotensin II like peptide-1 と CHO/rSENR 細胞膜画分を使用した結合阻害実験

実施例 17 で作製した [<sup>125</sup>I]標識ラット urotensin II like peptide-1 とラッ

ト SENR 発現 CHO 細胞の膜画分を使用した結合阻害実験の方法を以下に示す。実施例 1 6 に記載した、CHO/SENr 細胞から調製した膜画分を膜希釈緩衝液 (50 mM トリス塩緩衝液 (pH 7.4)、5 mM MgCl<sub>2</sub>、0.1% BSA、5 mM EDTA、0.5 mM PMSF、1 μg/ml pepstatin、4 μg/ml E64、20 μg/ml leupeptin) で希釈して、タンパク質濃度 60 μg/ml のアッセイ用細胞膜画分溶液をつくった。アッセイ用膜画分溶液 100 μl に、総結合を調べるために 20 pM [<sup>125</sup>I] 標識ラット utotensin II like peptide-I を含む膜希釈緩衝液、非特異的結合を調べるために 20 pM [<sup>125</sup>I] 標識ラット utotensin II like peptide-I と 2 μM 非アイソトープ標識ラット utotensin II like peptide-I を含む膜希釈緩衝液、さらにラット SENR に対する結合活性を調べる試料と 20 pM [<sup>125</sup>I] 標識ラット utotensin II like peptide-I を含む膜希釈緩衝液、各 100 μl をそれぞれ添加して室温で 60 分間反応させた。混合液をフィルター濾過し、さらにフィルターを膜希釈緩衝液 1.5 ml で 2 回洗浄した後、フィルターの放射活性をガンマカウンターにより測定した。特異的結合は、総結合から非特異的結合を減じた値である。被験試料のラット SENR 結合活性は、総結合から試料を加えた細胞膜画分の放射活性を減じた値の特異的結合に対する比率で示される。この実験において非標識ラット utotensin II like peptide-I による結合阻害が観測され、その IC<sub>50</sub> 値は 1.2 nM であった。また、同様の結合阻害実験は [<sup>125</sup>I] 標識したラット utotensin II like peptide-2 (配列番号: 15) あるいはマウス utotensin II like peptide (配列番号: 27) を用いても実施することができる。また、[<sup>125</sup>I] 標識したラット utotensin II like peptide-I および-2 あるいはマウス utotensin II like peptide とヒト SENR 発現 CHO 細胞の膜画分を用いても実施することができる。

(配列表フリーテキスト)

配列番号: 1 4

25 配列に関する他の情報: 第 11 番目および第 16 番目の 2 つの Cys 残基は分子内ジスルフィド結合を形成している。

配列番号: 1 5

配列に関する他の情報: 第 8 番目および第 13 番目の 2 つの Cys 残基は分子内ジスルフィド結合を形成している。

配列番号: 2 7

配列に関する他の情報: 第 11 番目および第 16 番目の 2 つの Cys 残基は分子内ジスルフィド結合を形成している。

配列番号: 3 1

5 配列に関する他の情報: 第 14 番目および第 19 番目の 2 つの Cys 残基は分子内ジスルフィド結合を形成している。

配列番号: 3 2

配列に関する他の情報: 第 18 番目および第 23 番目の 2 つの Cys 残基は分子内ジスルフィド結合を形成している。

10 配列番号: 3 3

配列に関する他の情報: 第 14 番目および第 19 番目の 2 つの Cys 残基は分子内ジスルフィド結合を形成している。

配列番号: 3 4

15 配列に関する他の情報: 第 18 番目および第 23 番目の 2 つの Cys 残基は分子内ジスルフィド結合を形成している。

#### 産業上の利用可能性

20 本発明のポリペプチドをコードする DNA または本発明のポリペプチドは、①本発明のポリペプチドの有する生理作用の探索、②合成オリゴヌクレオチドプローブあるいは PCR のプライマーの作成、③SENR のリガンドや前駆蛋白質をコードする DNA の入手、④組換え型レセプター-蛋白質の発現系を用いたレセプター結合アッセイ系の開発と医薬品候補化合物のスクリーニング、⑤抗体および抗血清の入手、⑥DNA、RNA、抗体または抗血清を用いた診断薬の開発、⑦中枢神経機能調節剤、循環機能調節剤、心臓機能調節剤、腎臓機能調節剤、泌尿器機能調節剤、感覚器官機能調節剤などの医薬の開発、⑧遺伝子治療等に用いることができる。

## 請求の範囲

1. 配列番号：14で表わされるアミノ酸配列と同一もしくはN末端にグルタミン残基またはピログルタミン酸残基を有し配列番号：14で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩。

2. 実質的に同一のアミノ酸配列が配列番号：15、配列番号：27、配列番号：31、配列番号：32、配列番号：33または配列番号：34で表わされるアミノ酸配列である請求項1記載のポリペプチド。

3. 配列番号：14、配列番号：15、配列番号：27、配列番号：31、配列番号：32、配列番号：33または配列番号：34で表わされるアミノ酸配列を有する請求項1記載のポリペプチド。

4. 請求項1記載のポリペプチドの前駆体タンパク質またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩。

5. 配列番号：13または配列番号：26で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する請求項4記載の前駆体タンパク質。

6. 請求項1記載のポリペプチドをコードする塩基配列を有するDNAを含有するDNA。

7. 配列番号：16、配列番号：17、配列番号：28、配列番号：35、配列番号：36、配列番号：37または配列番号：38で表わされる塩基配列を有する請求項6記載のDNA。

8. 請求項4記載の前駆体タンパク質をコードする塩基配列を有するDNAを含有するDNA。

9. 配列番号：12または配列番号：25で表わされる塩基配列を有する請求項8記載のDNA。

10. 請求項6または請求項8記載のDNAを含有する組換えベクター

11. 請求項10記載の組換えベクターで形質転換された形質転換体。

12. 請求項11記載の形質転換体を培養し、請求項1記載のポリペプチドまたは請求項4記載の前駆体タンパク質を生成、蓄積せしめ、これを採取することを特徴とする請求項1記載のポリペプチドまたは請求項4記載の前駆体タンパク質またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の製造法。

13. 請求項1記載のポリペプチドまたは請求項4記載の前駆体タンパク質またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩に対する抗体。

14. 請求項1記載のポリペプチドまたは請求項4記載の前駆体タンパク質またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を含有してなる医薬。

15. 請求項6または請求項8記載のDNAを含有してなる医薬。

16. 中枢機能調節剤、循環機能調節剤、心臓機能調節剤、腎臓機能調節剤、泌尿器機能調節剤または感覚器官機能調節剤である請求項14または請求項15記載の医薬。

17. 請求項1記載のポリペプチドまたは請求項4記載の前駆体タンパク質またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を用いることを特徴とす

る S E N R と請求項 1 記載のポリペプチドまたは請求項 4 記載の前駆体タンパク質またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法。

5 18. 請求項 1 記載のポリペプチドまたは請求項 4 記載の前駆体タンパク質またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を用いることを特徴とする S E N R と請求項 1 記載のポリペプチドまたは請求項 4 記載の前駆体タンパク質またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング用キット。

10

19. 請求項 17 記載のスクリーニング方法または請求項 18 記載のスクリーニング用キットを用いて得られる、S E N R と請求項 1 記載のポリペプチドまたは請求項 4 記載の前駆体タンパク質またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩。

15

20. 請求項 13 記載の抗体を用いることを特徴とする請求項 1 記載のポリペプチドまたは請求項 4 記載の前駆体タンパク質またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の定量方法。

20 21. 請求項 13 記載の抗体を含有することを特徴とする請求項 1 記載のポリペプチドまたは請求項 4 記載の前駆体タンパク質またはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩が関与する疾患の診断剤。

1/3

2/3



1

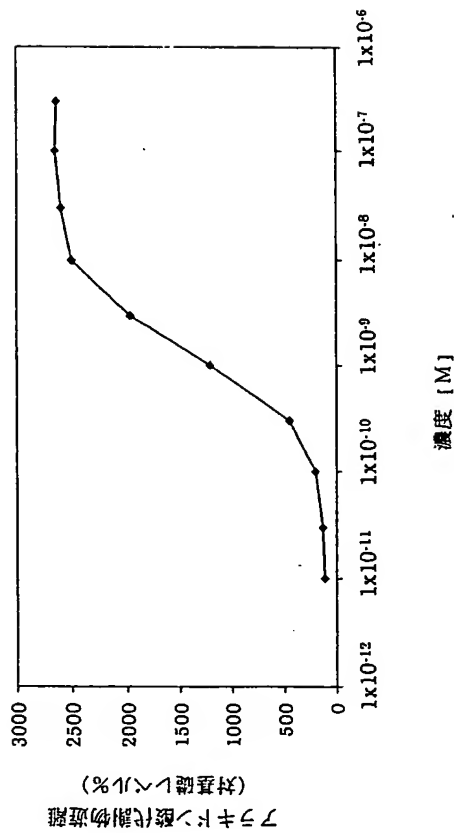
1 CTT CCC GTC CTC ATG GAC AGG GTG CCC TTC TGC CTC TTC GGA CTC CTC  
Met Asp Arg Val Pro Phe Cys Cys Leu Leu Phe Val Gly Leu Leu  
20 30  
AAT CCA CTC CTC TTT CCC GTC AGC GAC ACT GGT GAA ATG TCT CTT CAG CTT CCA GTG  
Asn Pro Leu Leu Ser Phe Pro Val Thr Asp Thr Gly Glu Met Ser Leu Gln Leu Pro Val  
40 50  
CTT GAG GAA AAT GCT CTT CGG GCT CTC GAG GAG CTC GAG AGG ACT GCC CTC CTC GAG AGG  
Leu Glu Glu Asn Ala Leu Arg Ala Leu Glu Glu Leu Glu Arg Thr Ala Leu Leu Gln Thr  
60 70  
CTG CGC CAG ACC GTG GGC ACA GAA GCA GAG GCA AGC CTT GGC CAG GCA GAT CCC AGT GCC  
Leu Arg Gln Thr Val Gly Thr Glu Ala Glu Gly Ser Leu Glu Gln Ala Asp Pro Ser Ala  
80 90  
GAG ACT CCC ACT CCA AGG GGA AGC TTG AGG AGC GCT CTC ACT GGG CAA GAT TCT AAC ACT  
Glu Thr Pro Thr Pro Arg Gly Ser Leu Arg Lys Ala Leu Thr Gly Gln Asp Ser Asn Thr  
100 110  
GTA CTG AGC CGT CTT TTG GCG AGA ACC AGG AAA CAA CGT AAG CAA CAC GGG ACT GCC CCA  
Val Leu Ser Arg Leu Leu Ala Arg Thr Arg Lys Gln Arg Lys Gln His Gly Thr Ala Pro  
120 123  
GAA TGC TTC TGG AAG TAC TGC ATT TGA AGA GAG AGC TCT CCT CAG AA  
Glu Cys Phe Trp Lys Tyr Cys Ile \*\*\*



2

1 10 20  
ATG GAC AGG GTG CCC TTC TGC CTC TTC ATA GGA CTT CTG AAT CCA CTG CTG TCC  
Met Asp Arg Val Pro Phe Cys Cys Leu Leu Phe Ile Gly Leu Leu Asn Pro Leu Leu Ser  
30  
CTT CCC GTC AGC GAC ACT GGT GAG AGG ACT CTT CAG CTT CCA CTG CTT GAG GAA GAC GCT  
Leu Pro Val Thr Asp Thr Gly Glu Arg Thr Leu Gln Leu Pro Val Leu Glu Glu Asp Ala  
50 60  
CTT CGG GCT CTC GAG GAG CTC GAG AGG ATG GCC CTC CTC GAG ACC CTG CGT CAG ACC ATG  
Leu Arg Ala Leu Glu Glu Leu Glu Arg Met Ala Leu Leu Gln Thr Leu Arg Gln Thr Met  
70 80  
GGC AGC GAA GCA GGG GAG AGC CCT GCA GAA GCA GGT CCC AGC ACT GAG ACT CCC ACT CCA  
Gly Thr Glu Ala Gly Glu Ser Pro Gly Glu Ala Gly Pro Ser Thr Thr Glu Thr Pro Thr Pro  
90 100  
CGG GGA AGC ATG AGG AAG GCT TTC GCT GGG CAA AAT TCT AAC ACT GTA CTG AGT CGT CTC  
Arg Gly Ser Met Arg Lys Ala Phe Ala Gly Gln Asn Ser Asn Thr Val Leu Ser Arg Leu  
110 120  
TTG GCA AGA ACC AGG AAA CAA CAT AAG CAA CAC GGG GCT GCC CCA GAG TGC TTC TGG  
Leu Ala Arg Thr Arg Lys Gln His Lys Gln His Gly Ala Ala Pro Glu Cys Phe Trp Lys  
123  
TAC TGC ATT TGA GGA GAC ACA AGC GCC GGT TGG TCT CTC AGA A  
Tyr Cys Ile \*\*\*

図 3



## SEQUENCE LISTING

<110> Takeda Chemical Industries, Ltd.

<120> Novel Physiologically Active Substance, Its Production and Use

5 <130> 2637WOOP

<150> JP 11-194091

<151> 1999-07-08

<160> 38

<210> 1

10 <211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

15 <400> 1

GATTTCTCTG GACAGATCC TAA 23

<210> 2

<211> 24

<212> DNA

20 <213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 2

TCAGACAG TATTTCCAGA AGCA 24

25 <210> 3

<211> 67

<212> DNA

<213> Rat

<400> 3

CACTGTACTG AGCGGTCTTT TGGGAGAAC CAGGAACAA CGTAAGCAAC ACGGGACTGC 60

CCCAGAA

67

<210> 4

5 <211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 4

10

CCAGAAGCAT TGTGGGGCAG TCCGGTG 27

<210> 5

<211> 30

<212> DNA

15 <213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 5

CACTCCCGTG TTGCTTACGT TGTTTCTGG 30

20

<210> 6

<211> 349

<212> DNA

<213> Rat

<400> 6

25

CTCCGGAGCA GACACCCAGC CAGANTTCTT CCCGTCGTCA TGCACAGGT GCCCTTCTGC 60

TGCCTGCTCT TGTAGGACT CCTGAATCCA CTCTGTCTT TTCCCGTCAC GGACACTGGT 120

GAAATGCTCT TTCAGCTTCC AGTGCTTGAG GAAATGCTC TTCGGGCTCT GGAGGAGCTG 180

GAGAGGACTG CCTCTCTGCA GACCTGCCC CAGACCTGG GCACAGAGC AGAGGGAAGC 240

CTTGCCAGG CAGATCCAG TCGGAGACT CCCACTCCA GGGGAAGCTT CAGGAAGGCT 300

CTCACTGGCC AAGATTCTAA CACTGTACTG AGCCTGTTT TGGCAGAA 349

<210> 7

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

5

<220>

<223>

<400> 7

GGACAAGATC CTAACACTGT ACTGAGCG 29

10 <210> 8

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

15 <223>

<400> 8

GAACAACGT AAGCAACAGG GGAC 24

<210> 9

<211> 274

20 <212> DNA

<213> Rat

<400> 9

GCCGCTTTT GCGGAGAAC AGGAACAAC GTAAGCAACA CGGACTGCC CCAGAATGCT 60

TCTGGAAGTA CTGCAATTGA AGAGAGACGT CTCCTCAGAA CCATCATTTC AGGAACATA 120

AGACCAGATG CTTGAGAAA AATCGTGCCA ACAAGCCCC GTTCTCCACT ATGAGAAATA 180

AACCTCTAT GTTCTCAAG TGTCAAAA AAAAAAAA AAAAAAAA AAAAAAAA 240

AAAAAAAAA AAAAAAAA AAAAAAAA AAAA 274

<210> 10

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

5 <400> 10

GGAGCAGACA CCCAGCCAGA CT 22

<210> 11

<211> 22

<212> DNA

10 <213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 11

CTTTAGTTTC CTGAAGTGAT GG 22

15 <210> 12

<211> 405

<212> DNA

<213> Rat

<400> 12

20 TCTTCCCGTC GTCATGGACA GGTGCCCTT CTGCTGCCCTG CTCCTCGTAG GACTCCTGAA 120

TCCACTCCTG TCTTTCCCG TCAGGGACAC TGGTGAAATG TCTCTTACG TTCACGTGCT 180

TGAGGAAAT GCTCTTGGG CTCTGGAGGA GCTGGAGAGG ACTGCCCTCC TGCAGACGCT 240

CGGCCAGACC GTGGGCACAG AAGCAGAGGG AAGCCTTGGC CAGGCAGATC CCAGTGCCGA 300

GACTCCCACT CCAAGGGGAA GCTTGAGGAA GGCTCTCACT GGGCAAGATT CTAACACTGT 360

25 ACTCAGCCGT CTTTGCCGA GAACAGGAA ACAAGGTAAG CAACAGGGGA CTGCCCCAGA 405

ATGCTTCTGG AAGTACTGCA TTGCAAGAGA CACGTCTCCT CAGA

<210> 13

<211> 123

<212> PRT



<213> Rat  
<400> 13  
Met Asp Arg Val Pro Phe Cys Cys Leu Leu Phe Val Gly Leu Leu Asn  
1 5 10 15  
5 Pro Leu Leu Ser Phe Pro Val Thr Asp Thr Gly Glu Met Ser Leu Gln  
20 25 30  
Leu Pro Val Leu Glu Glu Asn Ala Leu Arg Ala Leu Glu Glu Leu Glu  
35 40 45  
Arg Thr Ala Leu Leu Gln Thr Leu Arg Gln Thr Val Gly Thr Glu Ala  
50 55 60  
10 Glu Gly Ser Leu Gly Gln Ala Asp Pro Ser Ala Glu Thr Pro Thr Pro  
65 70 75 80  
Arg Gly Ser Leu Arg Lys Ala Leu Thr Gly Gln Asp Ser Asn Thr Val  
85 90 95  
15 Leu Ser Arg Leu Leu Ala Arg Thr Arg Lys Gln Arg Lys Gln His Gly  
100 105 110  
Thr Ala Pro Glu Cys Phe Trp Lys Tyr Cys Ile  
115 120  
20 <210> 14  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> Rat  
<223> Xaa shows pyroglutamic acid or glutamine  
<400> 14  
25 Xaa Arg Lys Gln His Gly Thr Ala Pro Glu Cys Phe Trp Lys Tyr Cys Ile  
1 10 17  
<210> 15  
<211> 14  
<212> PRT  
<213> Rat  
<223> Xaa shows pyroglutamic acid or glutamine  
<400> 18  
25 GGACGACACACCCAGCCAGA CT 22  
<210> 19  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<213> Rat  
<223> Xaa shows pyroglutamic acid or glutamine  
<400> 15  
Xaa His Gly Thr Ala Pro Glu Cys Phe Trp Lys Tyr Cys Ile  
5 10 14  
<210> 16  
<211> 51  
<212> DNA  
<213> Rat  
<400> 16  
10 CAACCTAAGC AACACGGGACT GCCCCAGAA TGCTTCTGGA AGTACTGCAT T 51  
<210> 17  
<211> 42  
<212> DNA  
<213> Rat  
<400> 17  
15 CAACACGGGA CTGCCCCAGA ATGCTTCTGG AAGTACTGCA TT 42  
<210> 18  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223>  
<400> 18  
25 GGACGACACACCCAGCCAGA CT 22  
<210> 19  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 19

TCAGACACAG TATTTCCAGA AGCATTCTGG 30

5

&lt;210&gt; 20

&lt;211&gt; 354

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Mouse

&lt;400&gt; 20

10

TCTCGCCGCA TCATGGACAG GGTGCCCTTC TGCTGCCTGC TCTTCATAGG ACTTCTGAAT 60  
CCTCTGCTGT CCTTCCCGT CAGGCACACT GGTGACAGGA CTCTTCAGCT TCCAGTCTTT 120  
GAGGAGACG CTCTTCGGGC TCTGGAGGAG CTGGAGAGGA TGGCCCTCTCT GCAGACCCCTG 180  
GCTCAGACCA TGGGCACGGA AGCAGGGGAG AGCCCTGGAG AAGCAGGTCC CAGCACTGAG 240  
ACTCCCACTC CACGGGGGAG CATGAGGAG GCTTTCCTG GGC AAAATTTC TAACACTGTA 300  
CTGAGTCGTC TCTTGGCAAG AACCAAGAAA CAACATAAGC AACACGGGGC TGCC 354

&lt;210&gt; 21

&lt;211&gt; 29

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

20

&lt;220&gt;

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 21

GGACAAGATC CTAACACTGT ACTGAGCGG 29

&lt;210&gt; 22

&lt;211&gt; 22

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 22

CTTAGTTTC CTGAAGTCAT GG 22

&lt;210&gt; 23

&lt;211&gt; 107

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Mouse

&lt;400&gt; 23

TCTCTTGGCA AGAACAGGA AACAACTAA GCAACACGGG GCTGCCCCAG AGTGCTTCTG 60

GAATACTGC ATTTGAGGAG ACACAAGCGC CCGTTGCTCT CTCAGAA 107

10

&lt;210&gt; 24

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 24

AGCCAGACGT CTCGCCGCAT C 21

&lt;210&gt; 25

&lt;211&gt; 403

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Mouse

&lt;400&gt; 25

ATGCACAGGG TGCCCTTCTG CTGCCTGCTC TTCATAGGAC TTCTGAATCC ACTGCTGTCC 60  
CTTCCCGTCA CGGACACTGG TGAGAGGACT CTTCAGCTTC CAGTGTCTGA GGAAGACGCT 120  
CTTCGGCTC TGGAGAGCT GGACAGGATG GCCCTCTCTGC AGACCTGCGG TCAGACCATG 180  
GGCAGCGAAG CAGGGGAGAG CCCTGGAGAA GCAGGTCCCA GCACTGAGAC TCCCACCTCA 240  
CGGGGAAGCA TCAGGAAGGC TTTCCGTGGG CAAAATTCTA ACACTGTACT GAGTCTCTTC 300  
TTGGCAAGAA CCAGGAACA ACATAGCCAA CACGGGGCTG CCCCAGAGTG CTTCCTGAAA 360  
TACTGCATTT GAGGACACAG AAGCGCCCGT TGGTCTCTCA GAA 403

9

10

&lt;210&gt; 26

&lt;211&gt; 123

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mouse

&lt;400&gt; 26

Met Asp Arg Val Pro Phe Cys Cys Leu Leu Phe Ile Gly Leu Leu  
1 5 10 15  
Asn Pro Leu Leu Ser Leu Pro Val Thr Asp Thr Gly Glu Arg Thr  
20 25 30

10 Leu Gln Leu Pro Val Leu Glu Glu Asp Ala Leu Arg Ala Leu Glu

Glu Leu Glu Arg Met Ala Leu Leu Gln Thr Leu Arg Gln Thr Met  
35 40 45

Gly Thr Glu Ala Gly Glu Ser Pro Gly Glu Ala Gly Pro Ser Thr  
50 55 60

15 Glu Thr Pro Thr Pro Arg Gly Ser Met Arg Lys Ala Phe Ala Gly  
65 70 75  
80 85 90

Gln Asn Ser Asn Thr Val Leu Ser Arg Leu Leu Ala Arg Thr Arg  
95 100 105

20 Lys Gln His Lys Gln His Gly Ala Ala Pro Glu Cys Phe Trp Lys  
110 115 120

Tyr Cys Ile

123

&lt;210&gt; 27

&lt;211&gt; 17

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mouse

&lt;223&gt; Xaa shows pyroglutamic acid or glutamine

&lt;400&gt; 27

Xaa His Lys Gln His Gly Ala Ala Pro Glu Cys Phe Trp Lys Tyr Cys Ile  
5 10 15 17

&lt;210&gt; 28

&lt;211&gt; 51

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Mouse

&lt;400&gt; 28

CAACATAAGC AACACGGGGC TGCCCCAGAG TGCTTCTGGA AATACTGCAT T 51

&lt;210&gt; 29

&lt;211&gt; 386

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Rat

&lt;400&gt; 29

Met Ala Leu Ser Leu Glu Ser Thr Thr Ser Phe His Met Leu Thr Val  
15 1 5 10 15

Ser Gly Ser Thr Val Thr Glu Leu Pro Glu Asp Ser Asn Val Ser Leu  
20 25 30

Asn Ser Ser Trp Ser Gly Pro Thr Asp Pro Ser Ser Leu Lys Asp Leu  
35 40 45

20 Val Ala Thr Gly Val Ile Gly Ala Val Leu Ser Ala Met Gly Val Val  
50 55 60

Gly Met Val Gly Asn Val Tyr Thr Leu Val Val Met Cys Arg Phe Leu  
65 70 75 80

Arg Ala Ser Ala Ser Met Tyr Val Tyr Val Val Asn Leu Ala Leu Ala  
85 90 95

25 Asp Leu Leu Tyr Leu Leu Ser Ile Pro Phe Ile Ile Ala Thr Tyr Val  
100 105 110

Thr Lys Asp Trp His Phe Gly Asp Val Gly Cys Arg Val Leu Phe Ser  
115 120 125

Leu Asp Phe Leu Thr Met His Ala Ser Ile Phe Thr Leu Thr Ile Met

130 135 140

Ser Ser Glu Arg Tyr Ala Ala Val Leu Arg Pro Leu Asp Thr Val Gln

145 150 155 160

5 Arg Ser Lys Gly Tyr Arg Lys Leu Leu Val Leu Gly Thr Trp Leu Leu

165 170 175

Ala Leu Leu Thr Leu Pro Met Met Leu Ala Ile Gln Leu Val Arg

180 185 190

Arg Gly Ser Lys Ser Leu Cys Leu Pro Ala Trp Gly Pro Arg Ala His

10 195 200 205

Arg Thr Tyr Leu Thr Leu Phe Gly Thr Ser Ile Val Gly Pro Gly

210 215 220

Leu Val Ile Gly Leu Leu Tyr Val Arg Leu Ala Arg Ala Tyr Trp Leu

225 230 235 240

15 Ser Gln Gln Ala Ser Phe Lys Gln Thr Arg Arg Leu Pro Asn Pro Arg

245 250 255

Val Leu Tyr Leu Ile Leu Gly Ile Val Leu Leu Phe Trp Ala Cys Phe

260 265 270

Leu Pro Phe Trp Leu Trp Gln Leu Leu Ala Gln Tyr His Glu Ala Met

20 275 280 285

Pro Leu Thr Pro Glu Thr Ala Arg Ile Val Asn Tyr Leu Thr Cys

290 295 300

Leu Thr Tyr Gly Asn Ser Cys Ile Asn Pro Leu Leu Tyr Thr Leu Leu

305 310 315 320

25 Thr Lys Asn Tyr Arg Glu Tyr Leu Arg Gly Arg Gln Arg Ser Leu Gly

325 330 335

Ser Ser Cys His Ser Pro Gly Ser Pro Gly Ser Phe Leu Pro Ser Arg

340 345 350

Val His Leu Gln Asp Ser Gly Arg Ser Leu Ser Ser Ser Gln

Gln Ala Thr Glu Thr Leu Met Leu Ser Pro Val Pro Arg Asn Gly Ala

355 360 365

370 375 380

Leu Leu

5

385

<210> 30

<211> 389

<212> PRT

<213> Human

<400> 30

Met Ala Leu Thr Pro Glu Ser Pro Ser Phe Pro Gly Leu Ala Ala

1 5 10 15

Thr Gly Ser Ser Val Pro Glu Pro Pro Gly Gly Pro Asn Ala Thr Leu

20 25 30

Asn Ser Ser Trp Ala Ser Pro Thr Glu Pro Ser Ser Leu Glu Asp Leu

35 40 45

Val Ala Thr Gly Thr Ile Gly Thr Leu Leu Ser Ala Met Gly Val Val

50 55 60

Gly Val Val Gly Asn Ala Tyr Thr Leu Val Val Thr Cys Arg Ser Leu

65 70 75 80

Arg Ala Val Ala Ser Met Tyr Val Tyr Val Val Asn Leu Ala Leu Ala

85 90 95

Asp Leu Leu Tyr Leu Leu Ser Ile Pro Phe Ile Val Ala Thr Tyr Val

100 105 110

Thr Lys Glu Trp His Phe Gly Asp Val Gly Cys Arg Val Leu Phe Gly

115 120 125

Leu Asp Phe Leu Thr Met His Ala Ser Ile Phe Thr Leu Thr Val Met

130 135 140

Ser Ser Glu Arg Tyr Ala Ala Val Leu Arg Pro Leu Asp Thr Val Gln

13

14

145 150 155 160  
Arg Pro Lys Gly Tyr Arg Lys Leu Ala Leu Gly Thr Trp Leu Leu  
165 170 175  
Ala Leu Leu Leu Thr Leu Pro Val Met Leu Ala Met Arg Leu Val Arg  
180 185 190  
Arg Gly Pro Lys Ser Leu Cys Leu Pro Ala Trp Gly Pro Arg Ala His  
195 200 205  
Arg Ala Tyr Leu Thr Leu Leu Phe Ala Thr Ser Ile Ala Gly Pro Gly  
210 215 220  
Leu Leu Ile Gly Leu Leu Tyr Ala Arg Leu Ala Arg Ala Tyr Arg Arg  
225 230 235 240  
Ser Gln Arg Ala Ser Phe Lys Arg Ala Arg Arg Pro Gly Ala Arg Ala  
245 250 255  
Leu Arg Leu Val Leu Gly Ile Val Leu Leu Phe Trp Ala Cys Phe Leu  
260 265 270  
Pro Phe Trp Leu Trp Gln Leu Leu Ala Gln Tyr His Gln Ala Pro Leu  
275 280 285  
Ala Pro Arg Thr Ala Arg Ile Val Asn Tyr Leu Thr Thr Cys Leu Thr  
290 295 300  
Tyr Gly Asn Ser Cys Ala Asn Pro Phe Leu Tyr Thr Leu Leu Thr Arg  
305 310 315 320  
Asn Tyr Arg Asp His Leu Arg Gly Arg Val Arg Gly Pro Gly Ser Gly  
325 330 335  
Gly Gly Arg Gly Pro Val Pro Ser Leu Gln Pro Arg Ala Arg Phe Gln  
340 345 350  
Arg Cys Ser Gly Arg Ser Leu Ser Ser Cys Ser Pro Gln Pro Thr Asp  
355 360 365  
Ser Leu Val Leu Ala Pro Ala Pro Ala Arg Pro Ala Pro Glu Gly  
370 375 380

Pro Arg Ala Pro Ala  
385  
<210> 31  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> Rat  
<400> 31  
Thr Arg Lys Gln Arg Lys Gln His Gly Thr Ala Pro Glu Cys Phe Trp  
1 5 10 15  
Lys Tyr Cys Ile 20  
<210> 32  
<211> 24  
<212> PRT  
<213> Rat  
<400> 32  
Leu Leu Ala Arg Thr Arg Lys Gln Arg Lys Gln His Gly Thr Ala Pro  
1 5 10 15  
Glu Cys Phe Trp Lys Tyr Cys Ile 24  
<210> 33  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> Mouse  
<400> 33  
Thr Arg Lys Gln His Lys Gln His Gly Ala Ala Pro Glu Cys Phe Trp  
1 5 10 15  
Lys Tyr Cys Ile 20

WO 01/04298

15

PCT/JP00/04484

WO 01/04298

16

PCT/JP00/04484

<210> 34

<211> 24

<212> PRT

<213> Mouse

<400> 34

Leu Leu Ala Arg Thr Arg Lys Gln His Lys Lys Gln His Gly Ala Ala Pro

1

5

Glu Cys Phe Trp Lys Tyr Cys Ile

20

24

10

<210> 35

<211> 60

<212> DNA

<213> Rat

<400> 35

ACCAGGAAC AACGTAGCA ACACGGGACT GCCCCAGAGT GCTTCTGGAA GTACTGCATT

15

<210> 36

<211> 72

<212> DNA

<213> Rat

<400> 36

CTTTGGCGA GAACGAGAA ACAACGTAG CAACACGGGA CTGCCCCAGA ATGCTTCTGG

72

AAGTACTGCA TT

20

<210> 37

<211> 60

<212> DNA

<213> Mouse

<400> 37

ACCAGGAAC AACATAAGCA ACACGGGGCT GCCCCAGAGT GCTTCTGGAA ATACTGCATT

25

<210> 38

<211> 72

<212> DNA

<213> Mouse

<400> 38

CTCTTGCGAA GAACGAGAA ACAACATAAG CAACACGGGG CTGCCCCAGA CTGCTTCTGG

72

AAATACTGCA TT

5

60

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JP00/04484	
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl. C12N15/12, 1/15, 1/19, 1/21, 5/10, C07K14/47, 16/18, 7/08, C12P21/02, A61K38/10, 38/17, 48/00, A61P25/28, 13/02, 13/12, 9/02, 9/12, 9/10, 27/00, G01N33/53, 33/56			
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl. C12N15/00-15/90, C07K11/00-19/00			
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの			
調査で使った電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) GENBANK/DBJ/EMBL/GENESEQ PIR/SWISSPROT/GENESEQ BIOSIS/MEDLINE/WPI (STN)			
C. 関連すると認められる文献		関連する請求の範囲の番号	
引用文献のカテゴリ	引用文献名 及び一部の出願が関連するときは、その関連する箇所の表示		
P, X	Biochem. Biophys. Res. Commun., 265(1), Nov. 1999 Masaki Mori et al., "Urotensin II is the endogenous ligand of a G-protein-coupled orphan receptor, SERN(GPR14)", p. 123-129	1-21	
P, X	Nature, 401, Sep. 1999 Robert S. Ames et al., "Human urotensin-II is a potent vasoconstrictor and agonist for the orphan receptor GPR14", p. 282-286	1-21	
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。			
* 引用文献のカテゴリ (A) 特に関連のある文献ではなく、一般的技术水準を示すもの (E) 国際出願日以前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの (L) 優先権主張に拠る発明を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) (O) 口頭による開示、使用、展覧等に及ぶ文献 (P) 国際出願日以前、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献 (T) 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの (X) 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの (Y) 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの (&) 同一パテントファミリー文献			
国際調査を完了した日		国際調査報告の発送日	
17. 10. 00		31.10.00	
国際調査機関の名称及びびて先 日本特許庁 (ISA/JJP) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (特許のある職員) 印 鈴木 恵理子 電話番号 03-3581-1101 内線 3448	

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JP00/04484	
C (続き) 関連すると認められる文献		関連する請求の範囲の番号	
引用文献のカテゴリ	引用文献名 及び一部の出願が関連するときは、その関連する箇所の表示		
P, X	Biochem. Biophys. Res. Commun., 266(1), Dec. 1999 Liu Qingyun et al., "Identification of urotensin II as the endogenous ligand for the orphan G-protein-coupled-receptor GPR14", p. 174-178	1-21	
P, X	FEBS Letters, 457, Aug 20 1999 Yolaine Coulouarn et al., "Cloning, sequence analysis and tissue distribution of the mouse and rat urotensin II precursors", p. 28-32	1-16, 20-21 17-19	
P, Y	WO, 2000-32627, A1 (TAKEDA CHEM IND LTD) 8. 6月. 2000 (08. 06. 00) 全文 & AU, 2000-14112, A	1-21	
X	Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95, Dec. 1998 Yolaine Coulouarn et al., "Cloning of the cDNA encoding the urotensin II precursor in frog and human reveals intense expression of the urotensin II gene in motoneurons of the spinal cord", p. 15803-15808	1-21	
A	Eur. J. Pharmacol., 149(1-2), 1988 Itoh H. et al., "Functional receptors for fish neuropeptide urotensin II in major rat arteries", p. 61-66	1-21	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP00/04484
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> Int. Cl. <sup>7</sup> C12N15/12, 1/19, 1/21, 5/10, C07K14/47, 16/18, 7/08, C12P21/02, A61K38/10, 38/17, 48/00, A61P25/28, 13/02, 13/12, 9/02, 9/12, 9/10, 27/00, G01N33/53, 33/56 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int. Cl. <sup>7</sup> C12N15/00-15/90, C07K1/00-19/00 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) GENBANK/DBJ/EMBL/GENESEQ PIR/SWISSPROT/GENESEQ BIOSIS/MEDLINE/WPI (STN)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P. X	Biochem. Biophys. Res. Commun., 265(1), Nov. 1999, Maeki Mori et al., "Urotensin II is the endogenous ligand of a G-protein-coupled orphan receptor, SENR (GPR14)", p.123-129	1-21
P. X	Nature, 401, Sep. 1999, Robert S. Ames et al., "Human urotensin-II is a potent vasoconstrictor and agonist for the orphan receptor GPR14", p.282-286	1-21
P. X	Biochem. Biophys. Res. Commun., 266(1), Dec. 1999, Liu Qingyun et al., "Identification of urotensin II as the endogenous ligand for the orphan G-protein-coupled-receptor GPR14", p.174-178	1-21
P. X P. Y	FEBS Letters, 457, Aug. 20 1999, Yolaïne Coulouarn et al., "Cloning, sequence analysis and tissue distribution of the mouse and rat urotensin II precursors", p.28-32	1-16, 20-21 17-19
P. X	WO, 2000-32627, A1 (TAKEDA CHEM IND LTD), 08 June, 2000 (08.06.00), Full text	1-21
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "X" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "Y" document of particular relevance (the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken into account) "Z" document of particular relevance (the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, each combination being obvious to a person skilled in the art) "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 17 October, 2000 (17.10.00)		Date of mailing of the international search report 31 October, 2000 (31.10.00)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP00/04484
<b>C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	& AU, 2000-14112, A Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95, Dec. 1998 Yolaïne Coulouarn et al., "Cloning of the cDNA encoding the urotensin II precursor in frog and human reveals intense expression of the urotensin II gene in motoneurons of the spinal cord", p.15803-15808	1-21
A	Sur. J. Pharmacol., 149(1-2), 1988 Itoh H. et al., "Functional receptors for fish neuropeptide urotensin II in major rat arteries", p.61-66	1-21